

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DEN STOFFWECHSEL DER SACCHAROSE-
GALACTOSIDE BEI CARYOPHYLLACEEN**

Guntram Schwarzmaier

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0062

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN STOFFWECHSEL DER SACCHAROSE-

GALACTOSIDE BEI CARYOPHYLLACEEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Guntram Schwarzmaier
aus
Taufkirchen
Dezember 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Beck

Tag der mündlichen Prüfung: 9.1.1974

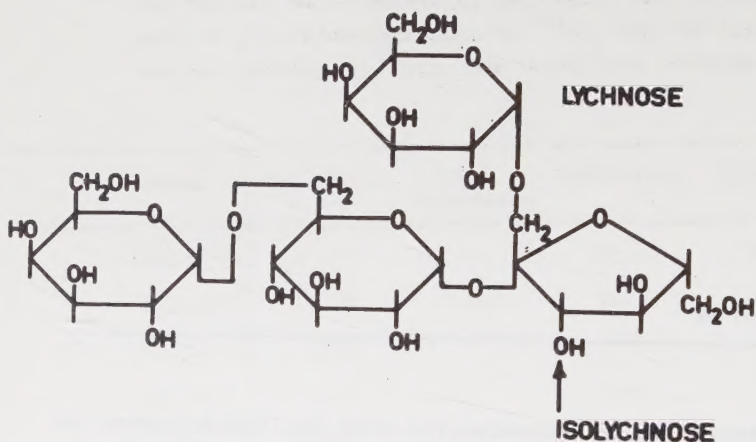
Meinen Eltern

1. Einleitung

Die Zucker der Raffinosefamilie sind bei Gymnospermen und Angiospermen weit verbreitet (French 1954, Stanek 1965). Das dürfte wohl auch ein Grund mit dafür sein, daß Raffinose schon vor über 100 Jahren - lange vor der Entwicklung der chromatographischen Analyse - 1856 von Berthelot entdeckt wurde. Die sich ebenfalls von der Raffinose ableitenden Galactoside, Lychnose und Isolychnose, wurden dagegen erst 1956 von Courtois et al. (1956) bei verschiedenen Caryophyllaceen und von Senser (unveröffentlichte Mitteilung) in Samen von *Sesamum indicum* gefunden.

Struktur der Lychnose- und Isolychnosezucker

Die Lychnose stellt ein Isomeres der Stachyose dar, wobei die zweite Galactose nicht wie bei Stachyose an die glucosylgebundene Galactose, sondern an die Fructose gebunden ist. Ihre Struktur wurde von Courtois et al. (1956) als α -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6) α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2) β -D-fructofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 1) α -D-galactopyranosid bestimmt. Die Isolychnose unterscheidet sich von der Lychnose nur durch die (3 $\rightarrow$ 1) statt der (1 $\rightarrow$ 1) -Bindung zwischen Fructose und Galactose.



Lychnose und Isolychnose sind die Anfangsglieder homologer Reihen höherer Galactoside, für die bis heute, wohl wegen ihres beschränkten Vorkommens, keine Trivialnamen geprägt wurden. Sie entstehen durch fortgesetzte (1→6)-Glycosidbindung mit je einem Molekül Galactose und besitzen folgende Struktur (Courtois et Ariyoshi 1960) : α -D-Galactopyranosyl (1→6) glucopyranosyl- (1→2)- β -D-fructofuranosyl (x→1) $\left[\alpha$ -D-galactopyranosyl (6→1) $\right]_n$ - α -D-galactopyranosid. Dabei gilt:

- n=0 : Tetrasaccharid Lychnose bzw. Isolychnose
- n=1 bis 4 : höhere homologe Galactoside
- x=1 : Galactoside der Lychnosereihe
- x=3 : Galactoside der Isolychnosereihe

Vorkommen der Lychnose- und Isolychnosezucker

Lychnose- und Isolychnosezucker konnten von Courtois et al. bei den untersuchten Caryophyllaceen nur in den Wurzeln und in einem Fall in Samen, nicht aber in Blättern festgestellt werden. Neben den Lychnose- und Isolychnosezuckern wurde stets Raffinose gefunden. Höhere Glieder der Raffinosefamilie konnten in den Wurzeln aber nur selten und dann auch nur in geringen Mengen gefunden werden.

In einigen Fällen konnten Courtois et al. (1960) auch zwei weitere Trisaccharide isolieren, bei denen es sich um Isomere der Planteose handelt. Sie leiten sich von Lychnose bzw. Isolychnose durch Abspaltung der an die Glucose gebundenen Galactose ab.

In den untersuchten Caryophyllaceensamen wurden bis jetzt an Saccharosegalactosiden meist nur Raffinose, in wenigen Fällen Stachyose und nur in *Silene cucubalus* Lychnose und Isolychnose gefunden. Höhere Galactoside wurden nicht beobachtet.

Die Zucker der Lychnose- und Isolychnosereihe treten nach Courtois et al. (1956, 1960, 1962) stets gemeinsam auf. Das Mengenverhältnis zwischen den Vertretern der beiden Oligosaccharidreihen scheint dabei jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen zu sein. Nach den Untersuchungen von Courtois et al. (1960, 1962) sollen im Frühjahr von April bis Juni die Oligosaccharide der Isolychnosereihe und im Herbst die der Lychnosereihe vorherrschen.

Eine starke jahreszeitliche Abhängigkeit der Zuckerkonzentration mit einem Maximum während der kalten Jahreszeit ist für die Raffinosezucker immer wieder festgestellt worden (Parker 1959, Jeremias 1962, 1964, 1969, Kandler et al. 1971). Da die im Herbst und Winter angehäuften Raffinosezucker zu Beginn der wärmeren Jahreszeit zum größten Teil oder auch ganz verschwinden, und künstliche Temperaturer-

niedrigung außerhalb der Hauptwachstumszeit (Jeremias 1964) zu einer Anreicherung der Raffinosezucker führt, ist ein Zusammenhang zwischen der Anreicherung der Raffinosezucker und der Erhöhung der Frostresistenz immer wieder diskutiert worden.

Obwohl genaue quantitative Bestimmungen der Lychnose- und Isolychnosezucker im Jahresverlauf bis jetzt nicht vorliegen, geht doch aus den Courtois'schen Untersuchungen hervor, daß bei den untersuchten Caryophyllaceen zwei deutlich getrennte Maxima des Oligosaccharidgehaltes existieren, wobei das Maximum zwischen April und Juni sogar in der Hauptwachstumsphase liegt. Es wäre deshalb durchaus denkbar, daß den Lychnosezuckern nicht die gleiche physiologische Funktion zukommt wie den Zuckern der Raffinosefamilie.

Die Rolle des Galactinols als Cofaktor bei der Biosynthese von Raffinose und Stachyose in Samen von *Phaseolus vulgaris* scheint nach den Untersuchungen von Tanner und Kandler (1967) sowie Tanner und Lehle (1972) gesichert zu sein. Da auch bei den von Courtois untersuchten Caryophyllaceen Raffinose in größeren Mengen vorkommt, wäre es denkbar, daß auch hier die Biosynthese der Raffinose mit Galactinol abläuft. Von Courtois (1960) war in einigen Fällen paralleles Auftreten von Stachyose und Lychnose festgestellt worden. Es taucht nun die Frage auf, auf welche Weise die Pflanze die Synthese der beiden verschiedenen Saccharosegalactoside reguliert und ob die Biosynthese der Lychnosezucker ebenfalls mit Galactinol als Cofaktor erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun Aussagen über die Biosynthese und den Umsatz sowie über die physiologische Rolle der Raffinose und der Lychnosezucker bei den Caryophyllaceen gewonnen werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Lychnosezucker tatsächlich auf die Caryophyllaceen beschränkt sind, wie es auf Grund der wenigen Angaben in der Literatur vermutet werden könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Pflanzen aus dem Freiland oder aus dem Botanischen Garten München verwendet. Zu jedem Versuch wurden stets mehrere Blätter bzw. Sprosse verwendet (bei großblättrigen Formen 2 - 4 Blätter, bei kleinblättrigen Formen 10 - 20 Blätter).

2.2. Application markierter Verbindungen

2.2.1. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$

Zur Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ wurde für abgeschnittene Pflanzenteile die von Kandler und Senger (1967) beschriebene Apparatur verwendet. Bei Versuchen an ganzen Pflanzen wurde das $^{14}\text{CO}_2$ in einem PVC-Beutel aus radioaktivem Bariumcarbonat entwickelt. Als Lichtquelle diente eine Osram-Concentra Lampe; die Beleuchtungsstärke betrug bei Photosynthese in der Assimilationskammer ca. 20 000 Lux, bei Photosynthese im PVC-Beutel ca. 10 000 Lux. Die Kühlung erfolgte im letzteren Fall durch einen Ventilator.

2.2.2. Fütterung ¹⁴C-markierter Zucker

Die bei jeder Probe eingesetzte Aktivitätsmenge betrug 2×10^6 cpm.

Von *Lamium album* wurde je ein Blatt mit dem Blattstiel in die Zuckerlösung (in einem Fiolaxröhrchen von 7 mm Durchmesser und ca. 15 mm Länge) gestellt. Bei *Cerastium arvense* und *Stellaria media* wurde ein aus einem Sproß ca. 5 cm hinter der Spitze herausgeschnittenes Sproßstück, das am oberen Ende ein Blattpaar trug, in die Zuckerlösung gestellt. Die Fütterung erfolgte im Licht (1 Osram Superlux-Lampe), die Beleuchtungsstärke betrug ca. 5000 Lux. Nach 6 Std. wurde die erste Probe (a) und nach insgesamt 24 Std. die zweite Probe (b) entnommen. Wenn die Zuckerlösung schon vor Versuchsende aufgesaugt war, wurde in das Fütterungsgläschen Leitungswasser nachgefüllt.

2.3. Extraktion

Nach Versuchsende wurden die Blätter zerkleinert und je nach Blattbeschaffenheit dreimal oder öfter mit 70 %igem Äthanol extrahiert (alkohollösliche Fraktion). Der Extraktionsrückstand wurde im Einschlußröhrchen 2 Std. mit 1 n HCl hydrolysiert (Hydrolysat). Der unhydrolysierbare Rest wurde in einem Oxymat der Firma Intertechnique verbrannt.

2.4. Trennverfahren

2.4.1. Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgte absteigend auf Whatman No. 1 bei 25° C. Folgende Fließmittel wurden dabei verwendet: (v/v)

- 1: Phenol/Wasser/Eisessig/1m EDTA =
840/160/10/1
- 2: Butanol/Äthylacetat/Eisessig/Wasser =
4/3/2,5/4
- 3: Butanol/Wasser (Lsg.1) - Propionsäure/Wasser (Lsg.2) = 1/1
Lösung 1: n-Butanol/Wasser = 750/50
Lösung 2: Propionsäure/Wasser = 352/448
- 4: Butanol/Pyridin/Wasser/Eisessig =
60/40/30/3

Zweidimensionale Trennung erfolgte in den Lösungsmittelkombinationen 1+3 (I), 1+2 (IV) und 3+4 (II). Zur Auftrennung von Oligosacchariden wurde bevorzugt die Lösungsmittelkombination IV eingesetzt (s. Abb.11).

2.4.2. Säulenchromatographie

Die Auftrennung von Zuckerkonzentraten durch Säulenchromatographie zur präparativen Darstellung der Lychnose wird im Kapitel "Ergebnisse" (3.1.1.) beschrieben.

2.4.3. Hochspannungselektrophorese

Zur Trennung geladener von ungeladenen Zuckerverbindungen (z.B. UDP-Zucker von Lychnose nach eindimensionaler Chromatographie in Lösungsmittel 2) sowie zur weiteren Charakterisierung von Oligosacchariden führten wir Hochspannungselektrophorese mit folgenden Puffersystemen durch:

- 1: Triäthylamin 0,1 m, pH 9,2
- 2: Natriumborat 0,05 m, pH 9,8
- 3: Ammoniumformiat 0,2 m, pH 3,7

Tabelle 1 gibt die R_{Glucose} - Werte verschiedener Zucker bei Elektrophorese in Na-Borat-Puffer wieder:

Tab. 1: R_{Glucose} -Werte verschiedener Zucker bei Elektro-
phorese in Na-Borat-Puffer, pH 9,8

Saccharose	0,19	Manninotriose	0,73
Melibiose	0,81	Stachyose	0,18
Raffinose	0,29	Lychnose	0,23

2.5. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivitätsmessung aliquoter Teile des äthanol-löslichen Extraktes erfolgte in unendlich dünner Schicht im endfensterlosen Methandurchflußzählrohr. Bei geringen Aktivitäten sowie bei der Zählung des verbrannten unhydro-lisierbaren Rückstandes wurden die Aliquots unter Zugabe von Methanol als Lösungsvermittler in einem Zählcocktail (7 g Butyl-PBD in 1 l Toluol) im Scintillationsspektro-meter LS 250 der Fa. Beckman Instruments INC., Fullerton, California gemessen.

Radioaktive Flecken auf Papierchromatogrammen und Phero-grammen wurden nach der Lokalisation durch Radioautographie auf Agfa Röntgenpapier bzw. Agfa Röntgenfilm Curix RP mit einem großflächigen Methandurchflußzählrohr mit Endfenster ausgemessen.

Die bei den drei Meßverfahren erhaltenen Werte wurden auf dpm umgerechnet.

2.6. Quantitative Bestimmungsmethoden

Die quantitative Bestimmung von Zuckern konnte bei Mono-sacchariden nach eindimensionaler chromatographischer Auf-trennung aus dem Eluat vorgenommen werden; Oligosaccharide wurden erst noch enzymatisch hydrolysiert.

Im einzelnen erfolgte die Bestimmung

- a) von Glucose und Fructose enzymatisch nacheinander aus dem gleichen Ansatz. Zuerst wurde Glucose mit G-6-P-Dehydrogenase bestimmt; anschließend wurde die phosphorylierte Fructose mit Hilfe von Phospho-Glucose-Isomerase in Glucose-6-P umgesetzt, mit der noch vorhandenen G-6-P-Dehydrogenase oxidiert und die Fructose aus der Differenz zwischen Endwert und Glucoseanfangswert errechnet (Bernt und Bergmeyer 1970).
- b) der Saccharose nach enzymatischer Spaltung durch Messung der Glucose mit Glucoseoxidase nach Bergmeyer (1970).
- c) von Melibiose und Raffinose durch Bestimmung von Glucose und Fructose (siehe a) in dem gemeinsamen Eluat im Anschluß an die enzymatische Hydrolyse mit α -Galactosidase und Invertase. Raffinose konnte aus der Menge an Fructose, Melibiose aus der Differenz zwischen der Gesamtglucose und der Fructose errechnet werden.
- d) der Lychnose nach enzymatischer Spaltung mit α -Galactosidase und Invertase durch Messung der Glucose wie unter b).
- e) der Galactose chromatographisch aufgetrennter Oligosaccharide mit Galactosedehydrogenase nach vorangegangener enzymatischer Hydrolyse.

Zur Bestimmung der Gesamtgalactose in Rohextrakten wurde ein 10 mg Frischgewicht entsprechendes Aliquot des Extraktes durch Aufblasen von Luft eingengt und 2 Std. mit 1 n HCl bei 100° C hydrolysiert. Die Hydrolysedauer von 2 Std. war in einer Testreihe durch Hydrolyse einer bekannten Stachyosemenge ermittelt worden. Da während der Hydrolyse etwas Galactose zerstört wird, wurde bei der Testreihe auch der Galactoseverlust durch Vergleich des Ergebnisses einer enzymatischen Hydrolyse mit denen der sauren Hydrolysen verschiedener Zeiten bestimmt; nach der 2-stündigen sauren Hydrolyse lag er bei 26 %. Die gemessenen Gesamtgalactosewerte wurden deshalb mit dem Faktor 1,35 multipliziert.

2.7. Analyse der ^{14}C -Verteilung in Oligosacchariden

Aus Chromatogrammen abeluierte Substanzen wurden stufenweise sauer oder enzymatisch hydrolysiert. Nach jedem Hydrolyseschritt erfolgte eine chromatographische Auftrennung. Im einzelnen wurde

- a) Saccharose mit Invertase gespalten.
- b) Raffinose mit reiner Invertase zu Melibiose und Fructose hydrolysiert. Isoplanteose und Maltotriose bleiben dabei ungespalten. Inkubation mit Emulsin ergab nach etwa 18 Std. nur eine etwa 20 %ige Spaltung; deshalb wurde Emulsin nicht weiter verwendet.
- c) Lychnose mit reiner Invertase versetzt und dabei eventuell vorhandene Stachyose durch Spaltung in Manninotriose und Fructose abgetrennt. Lychnose wurde dann 5 min mit 0,1 n HCl hydrolysiert. Dabei erfolgte eine vollkommene Spaltung in die beiden Disaccharide Melibiose und Fructosylgalactose, die ihrerseits mit α -Galactosidase hydrolysiert wurden.
- d) die nach enzymatischer Spaltung aus Stachyose erhaltene Manninotriose 5 min mit 1 n HCl partiell hydrolysiert. Die dabei erhaltene Melibiose wurde mit α -Galactosidase gespalten. Die Berechnung der inneren Galactose erfolgte durch Kombination der Ergebnisse der Melibioseanalyse und einer enzymatischen Totalhydrolyse von Manninotriose.

2.8. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der nephelometrischen Methode (nach Böck und Bailey, verändert). Dazu wurde das Protein mit 10 %iger Trichloressigsäure gefällt und nach 30 sec die Trübung bei 436 nm gemessen. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet.

2.9. Herkunft der Chemikalien

$\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (256 mCi/g) stammte von den Farbwerken Höchst.

U-¹⁴C-markierte Galactose (60,5 mCi/mM) und UDP-U-¹⁴C-Galactose (274,6mCi/mM) wurden von New England Nuclear, Boston, Mass. und U-¹⁴C-Saccharose (60 mCi/mM) vom Radiochemical Centre, Amersham England bezogen. Die anderen, in Enzym- und Fütterungsversuchen verwendeten markierten Zucker stammten aus Photosyntheseversuchen mit *Lamium maculatum* (3 Std. in ¹⁴CO₂).

Lychnose wurde durch Säulenchromatographie aus Caryophyllaceen-extrakten gewonnen.

Ein Tetrasaccharidgemisch aus Wurzeln von *Silene cucubalus* wurde freundlicherweise von Prof.J.E.Courtois und M^{lle} Ariyoshi zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Enzyme stammten von der Firma Boehringer, Mannheim. Das unlösliche Polyvinylpyrrolidon wurde von den Bio-Rad- Laboratories gekauft.

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer, Merck, Roth und Schuchardt bezogen.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung von Oligosacchariden in Caryophyllaceen

3.1.1. Isolierung und Identifizierung von Lychnose aus Blättern und Sprossen von Dianthus caryophyllus

Blätter und Sprosse von *Dianthus caryophyllus* oder anderer stark lychnosehaltiger Caryophyllaceen wurden noch während der winterlichen Frostperiode geerntet, im gefrorenen Zustand zerkleinert und dreimal mit 70 %igem Äthanol extrahiert. Die gesammelten Extrakte wurden abzentrifugiert und unter reduziertem Druck eingeeengt. Durch Zugabe von kochendem 96 %igen Äthanol wurde der Extrakt auf eine Endkonzentration von ca. 80 % gebracht und anschließend über Nacht kalt gestellt. Die anderntags ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert. Anschließend wurde wieder eingeeengt, und durch Zugabe von Aceton und Petroläther ein bräunliches Zuckerkonzentrat ausgefällt, das über Phosphorpentoxid getrocknet wurde.

3.1.1.1. Die Trennung des Zuckerkonzentrates wurde zunächst an einer Kohle-Celite-Säule (Volumenverhältnis 1:1) nach Whistler und Durso (1959) vorgenommen. Pro 150 ml Säulenvolumen wurde 1 g Zuckerkonzentrat aufgetragen. In einem

offenen System wurde ein linearer Alkoholgradient von 0-30 % verwendet. Der Elutionsvorgang wurde mit Anthronreagens (Snell and Snell) semiquantitativ verfolgt und das Eluat chromatographisch analysiert.

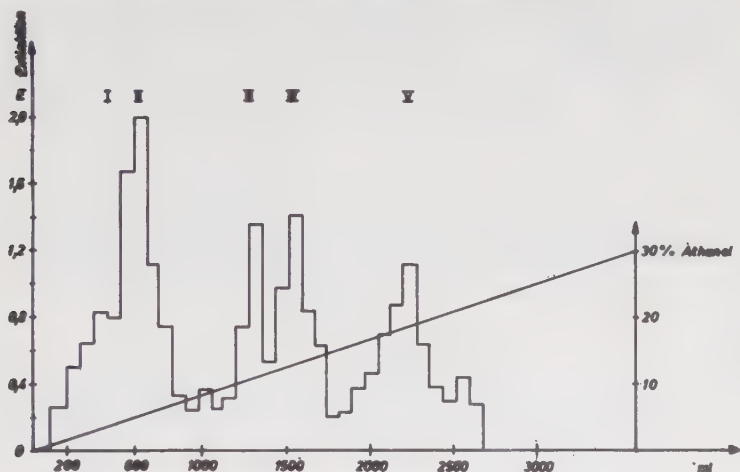


Abb. 1 Säulenchromatographie eines Blattextraktes von *Lychnis flos cuculi* an einer Kohle-Celite-Säule

I = Melibiose

IV = Lychnose

II = Saccharose

V = höhere Oligosaccharide

III = Raffinose

Wie die Abb. 1 zeigt, wird die Lychnose bei einem Alkoholgehalt von ca. 12-13 % eluiert; dieser Wert liegt etwas über dem von Courtois mit 9-10% angegebenen Alkoholgehalt.

3.1.1.2. Da die Elutionsdauer der Kohle-Celite-Säule relativ lang, das Volumen der stets mit Salzen verunreinigten Eluate relativ hoch ist und höhere Oligomere der Lychnose fast gar nicht getrennt werden, wurden Zuckerkonzentrate später überwiegend auf einer Ionenaustauschersäule (Dowex 50 WX 2, 200-400 mesh, Li^+ -Form) aufgetrennt (Jones, Wall, Pittet, 1960), bei der die oben genannten Nachteile weitgehend vermieden sind. Auf die Säule (Länge 200 cm, Durchmesser 2 cm) wurden 0,5 g Zuckerkonzentrat aufgetragen und mit Wasser eluiert. Da die Ionenaustauschersäule als

Molekularsieb wirkt, erfolgt eine stufenweise Elution, wobei die höheren Oligosaccharide zuerst im Eluat erscheinen. Diese Verhältnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

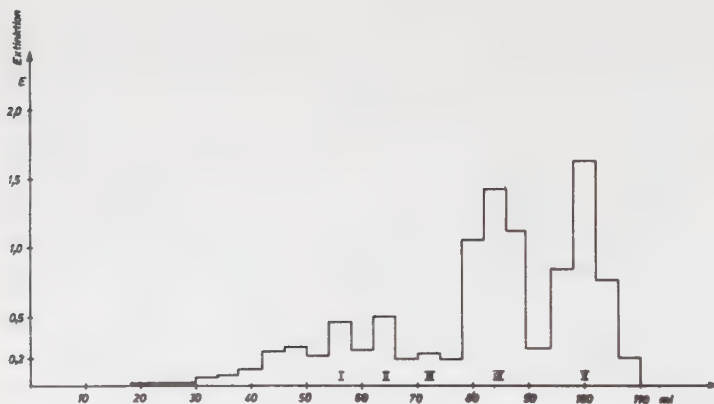


Abb. 2 Elutiondiagramm einer Dowex - 50 WX 2 - Säule
Auftrennung eines Zuckerkonzentrates aus
Dianthus caryophyllus

I = Heptasaccharid

IV = Lychnose

II = Hexasaccharid

V = Raffinose

III = Pentasaccharid

Die gesammelten lychnosehaltigen Eluate wurden eingengt und durch Gefriertrocknen als weißes Pulver erhalten. Versuche zur Kristallisierung der Lychnose blieben wie schon bei Courtois erfolglos.

Die Identifizierung der Lychnose wurde auf folgendem Wege vorgenommen:

- a) Chromatographie in den Lösungsmittelkombinationen I und IV (s. Abb. 11) ergab für markierte Lychnose (aus Photosyntheserversuchen in $^{14}\text{CO}_2$) mit Test-Lychnose aus *Silene cucubalus* bzw. der aus der Säule erhaltenen Lychnose übereinstimmendes Laufverhalten. Tab. 2 gibt das Laufverhalten von Lychnose, Stachyose, Iso-Lychnose und Galactinol in verschiedenen Laufmitteln an:

Tab. 2 : R_{Raffinose}-Werte für Lychnose, Stachyose, Iso-Lychnose und Galactinol in der Papierchromatographie in verschiedenen Laufmitteln

Laufmittel	1	2	3	4
Lychnose Stachyose	0,66	0,72	0,57	0,56
Iso-Lychnose	1,00	0,81	0,70	0,68
Galactinol	0,66	0,89	0,91	0,70

- b) Die saure Hydrolyse in 1 n HCl, 60 min ergab die Monosaccharide Galactose, Glucose und Fructose.
- c) Partialhydrolyse (5 min 0,1 n HCl) ergab eine vollständige Spaltung in Melibiose und Fructosyl-Galactose. Melibiose wurde durch ihr Laufverhalten in der Papierchromatographie (Lösungsmittelkombinationen I und II, s. Abb. 3) und der Boratelektrophorese bei pH 9,2 sowie durch die Analyse der Spaltprodukte nach saurer bzw. enzymatischer Hydrolyse eindeutig als Melibiose

identifiziert. Fructosyl-Galactose aus Lychnose, die ein Isomeres der Planteobiose (Fru 6→1 Gal, aus Planteose durch Glucoseabspaltung gewonnen) ist, lieferte nach enzymatischer Hydrolyse mit α -Galactosidase Fructose und Galactose; Spaltungsversuche mit β -Fructosidase und Emulsin blieben dagegen ohne Erfolg.

d) Enzymatische Hydrolyse:

Lychnose wird, wie bereits von Courtois et al. gezeigt, von β -Fructosidase und α -Glucosidase nicht angegriffen, verfügt also weder über eine endständige Fructose noch eine endständige Glucose.

α -Galactosidase zerlegte, entsprechend Befunden von Courtois, Lychnose in Saccharose und Galactose.

e) Die quantitative enzymatische Analyse der Spaltprodukte nach enzymatischer Totalhydrolyse ergab ein Verhältnis von Gal/Glu/Fru wie 2/1/1.

f) Der von uns ermittelte Drehwert für Lychnose in wäßriger Lösung $[\alpha]_D^{20}$ von $+145,3^\circ$ stimmt gut mit den von Courtois für Lychnose aus *Dianthus caryophyllus* ermittelten Werten von $144,2 - 147^\circ$ überein.

Ein Schnellverfahren zur Unterscheidung der Lychnose von der sich chromatographisch gleich verhaltenden Stachyose wird unter 3.1.3. beschrieben.

3.1.2. Identifizierung der Iso-Lychnose

Zur Zeit der Galactosidspeicherung erschien auf den Chromatogrammen der Lösungsmittelkombinationen I und IV unterhalb der Raffinose (s. Tab.2, Abb.11) ein deutlich abgesetzter Fleck einer nicht reduzierenden Substanz, bei der es sich auf Grund der Laufstrecke um ein Tri- oder Tetrasaccharid handeln konnte.

a) Die saure Totalhydrolyse (60 min, 0,1 n HCl) lieferte

Galactose, Glucose und Fructose.

- b) Die saure Partialhydrolyse (30 min, 0,1 n HCl) ergab zwei Disaccharide, die analog zur Untersuchung der Lychnose analysiert wurden und sich als Melibiose und eine Fructosyl-Galactose erwiesen.
- c) Die enzymatische Hydrolyse:
Die Substanz wird wie Lychnose von β -Fructosidase und α -Glucosidase nicht angegriffen. α -Galactosidase spaltet in Galactose und Saccharose.
- d) Die nach enzymatischer Totalhydrolyse mit α -Galactosidase und β -Fructosidase entstandenen Spaltprodukte standen wie bei Lychnose im Verhältnis 2/1/1.

In allen diesen Merkmalen, mit Ausnahme der Chromatographie und der sauren Partialhydrolyse, verhielt sich die Substanz wie Lychnose. Es handelt sich deshalb wohl um die von Courtois beschriebene Iso-Lychnose, die sich von der Lychnose nur durch die Verknüpfung von Fructose und Galactose (Fru 3 $\rightarrow$ 1 Gal statt Fru 1 $\rightarrow$ 1 Gal) unterscheidet.

Die von Courtois in Äthylacetat ermittelten Laufwerte von $R_{\text{Raffinose}}$ 0,71 für Lychnose und 0,81 für Iso-Lychnose wurden auch unter den von uns gewählten Bedingungen (25° C, 3 x 12 Std. Laufzeit) erhalten (s. Tab. 2). Der direkte chromatographische Vergleich der unbekannten Substanz mit einem Tetrasaccharidgemisch (Lychnose und Iso-Lychnose aus *Silene cucubalus*, von M^{lle} Ariyoshi dankenswerterweise zur Verfügung gestellt) ergab gleiches Verhalten wie die Iso-Lychnose.

Wegen den geringen vorgefundenen Iso-Lychnosemengen wurde eine präparative Anreicherung nicht durchgeführt.

Die von Courtois angegebenen Mengenverhältnisse zwischen Lychnose und Iso-Lychnose, wonach im Frühjahr die Tetrasaccharidfraktion im wesentlichen aus Iso-Lychnose und nur

wenig Lychnose bestehen sollte, konnten bei unseren Untersuchungen allerdings nicht bestätigt werden. Von den lychnosehaltigen Caryophyllaceen enthielten die einen unabhängig von der Jahreszeit gar keine Iso-Lychnose, die anderen enthielten zwar sowohl im Herbst als auch im Frühjahr Iso-Lychnose, aber nur in Bruchteilen der Lychnosemenge.

3.1.3. Identifizierung von Stachyose und Manninotriose

Eine chromatographische Trennung von Lychnose und Stachyose ist in den von uns verwendeten Lösungsmitteln nicht möglich (s. auch Abb.12). Aus den Chromatogrammen wurde deshalb die Tetrasaccharidbande eluiert und mit β -Fructosidase versetzt. Eventuell vorhandene Stachyose wurde in Fructose und das reduzierende Trisaccharid Manninotriose gespalten, das sowohl durch Chromatographie als auch durch quantitative Bestimmung der Spaltprodukte nach enzymatischer Hydrolyse identifiziert wurde. Im Gemisch mit Stachyose vorliegende Lychnose bleibt hierbei unverändert; Manninotriose lässt sich ohne Schwierigkeit von Lychnose in den Lösungsmittelkombinationen I und IV, sowie eindimensional durch ausreichend lange Laufzeit in Lösungsmittel 2 abtrennen.

Pflanzenextrakte mit noch unbekannter Oligosaccharidzusammensetzung wurden mit folgendem Schnellverfahren auf Stachyose untersucht: ein Rohextrakt von 10 mg Frischgewicht wurde durch Aufblasen von Luft eingeengt und dann mit 200 μ l Acetatpuffer pH 4,5 und 20 μ l Invertase über Nacht inkubiert. Dabei wurden Stachyose zu Manninotriose, Raffinose zu Melibiose und Saccharose zu Glucose und Fructose hydrolysiert. Bei der anschließend eindimensionalen Chromatographie dieses hydrolysierten Extraktes wurde parallel eine äquivalente Menge eines unhydrolysierten Rohextraktes aufgetragen. Der Vergleich der beiden Auftrennungen erlaubte dann eine Aussage über das Oligosaccharidspektrum.

Auf Grund des Verhaltens in der Chromatographie und der enzymatischen Hydrolyse dürfte es sich um ein schon von Courtois (1959, 1960) als Iso-Planteose beschriebenes Abbauprodukt der Lychnose handeln, das durch Abspaltung der glucosylgebundenen Galactose entsteht.

3.2. Verbreitung von Saccharosegalactosiden bei Centrospermen und nahe verwandten Gruppen

In Tabelle 3 sind Pflanzen aus den Reihen der Polygonales, der Centrospermen und der Cactales* aufgeführt, die auf den Gehalt an Saccharosegalactosiden in ihren verschiedenen Pflanzenteilen untersucht wurden.

Außerhalb der Centrospermen konnten Lychnosezucker weder bei den Polygonales, noch bei den Cactales* gefunden werden. Innerhalb der Centrospermen wurden die Molluginaceen und die Caryophyllaceen intensiver untersucht, da sie als die beiden einzigen Familien Anthocyane statt Betacyanen enthalten. Die Molluginaceen, meist einjährige Kräuter aus tropischen oder subtropischen Trockengebieten, erwiesen sich als weitgehend frei von Saccharosegalactosiden. Bei den wenigen positiven Befunden handelte es sich um Raffinosezucker. Auch keine andere Familie außer den Caryophyllaceen enthielt Lychnose.

Bei den Caryophyllaceen sind die Lychnosezucker neben der Saccharose die dominierenden Oligosaccharide; daneben treten in den meisten Pflanzen auch Zucker der Raffinosefamilie auf. Saccharosegalactoside vom Lychnosetyp konnten nicht nur in Speicherorganen wie Wurzeln und Sprossen, sondern auch in den Blättern nachgewiesen werden. Die Verteilung der Galactoside auf die einzelnen Pflanzenteile zeigte im Jahresverlauf charakteristische Veränderungen, auf die bei der Beschreibung des Jahresganges verschiedener Zucker noch näher eingegangen wird.

* Einteilung nach Engler, Syllabus der Pflanzenfamilien

Die Analyse der Samen brachte ein überraschendes Ergebnis: Sämtliche untersuchten Caryophyllaceensamen enthielten an Stelle der Lychnosezucker Galactoside der Raffinosereihe. Das höchste, hier auftretende Oligomere war das Tetrasaccharid Stachyose. Da es sich bei dem Nährgewebe der Caryophyllaceen um ein Perisperm, also ein der Mutterpflanze entstammendes Gewebe handelt, liegt offenbar im reproduktiven Bereich eine gewisse physiologische Umstimmung bezüglich der Oligosaccharidsynthese vor.

Tab. 3: Vorkommen von Raffinose, Melibiose, Lychnose, Isolychnose und Stachyose in den verschiedenen Pflanzenteilen bei Centrospermen und nahe verwandten Pflanzengruppen. Positiver Nachweis bei Angabe von B(Blatt), S(Sproß), W(Wurzel), Blkn(Blütenknospen), Sa(Samen) und BS(Blatt u. Sproß gemeinsam extrahiert). Bei mit * bezeichneten Proben handelte es sich um Herbarmaterial.

FAMILIE	ART	UNTERSUCHTE PFLANZEN- TEILE	RAFFI- NOSE	MELI- BIOSE	LYCH- NOSE	ISO- LYCH- NOSE	STA- CHYOSE
Polygona- ceae	Polygonum viviparum L.	Sa	Sa	-	-	-	Sa
Phytolacca- ceae	Phytolacca acinosa Roxb. Phytolacca dioica L.	B, S B, S	S B	S -	- -	- -	- -
Nyctagina- ceae	Oxybaphus nyctina- geus (Michx) Sweet.	S, W	S, W	-	-	-	S, W
Mollugin- ceae	Glinus lotooides L. Glinus mollugo Fenzl Glinus oppositifolius (L.) DC. Hypertelis angrae pequenae Friedr. Hypertelis bowkeriana Sonder Mollugo cerviana (L.) Ser.ex DC. Mollugo stricta L.	Sa, (BS)* (BS)* (BS)* (BS)* (BS)* B, Sa, S Sa, (BS)*W* (BS)*	- - - - - Sa - -	- - - - - - -	- - - - - - -	- - - - -	

Tab. 3 ff.

FAMILIE	UNTERFAMILIE	ART	UNTERSCHIEDLICHE PFLANZEN- THEILE	HAFFIGE NOSE	MELI- BLOSE	LYCH- NOSE	ISO- LYCH- NOSE	STA- CHYOSE
Molluginaceae		<i>Mollugo nudicaulis</i> Lam.	Sa, S*, W*	W	-	-	-	W
		<i>Mollugo verticillata</i> L.	(BS)*	-	-	-	-	-
		<i>Pharracaeum album</i> L. fil.	(BS)*	-	-	-	-	-
		<i>Pa. confertum</i> Ecklon & Zeyher	(BS)*	-	-	-	-	-
Portulacaceae		<i>Portulaca grandiflora</i> Hooker	(BS)	-	-	-	-	-
		<i>Portulacaria affra</i> Jacq.	B, S	-	-	-	-	-
		<i>Boussingaultia baselloides</i> Kun.	B, S	-	-	-	-	-
Caryophyllaceae	Paronychioideae	<i>Herniaria glabra</i> L.	B, S	B, S	B, S	B, S	-	B, S
		<i>Herniaria latifolia</i> Lapeyr.	B, S	B, S	B, S	B, S	-	B, S
		<i>Paronychia anatolica</i> Czecz.	(BS)	(BS)	-	-	-	-
		<i>Telephium imperati</i> L.	(BS)	(BS)	-	-	-	-
		<i>Cerastium arvense</i> L.	B, S, W	B, S, W	B, S, W	B, S, W	B, S, W	-
		<i>Cerastium alpinum</i> L.	Sa	Sa	-	-	-	Sa
Alainoiaceae		<i>Minuartia hybrida</i> Schischk.	B, S, Sa	B, S, Sa	B, S	B, S	B, S	Sa
		<i>Moehria trinervia</i> Clairv.	B, S, W	B, S, W	B, S	W	W	-

FAMILIE	UNTERFAMILIE ODER TRIBUS	ART	UNTERSUCHTE PFLANZEN- TEILE	RAFFI- NOSE	MELI- BIOSE	LYCH- NOSE	ISO- LYCH- NOSE	STA- CHYOSE
Caryophylla- ceae	Alsinoideae	<i>Soleranthus annuus</i> L.	(BS)	(BS)	(BS)	(BS)	(BS)	-
		<i>Stellaria graminea</i> L.	B,S,W	B,S,W	B,S,W	B,S,W	B,S,W	-
		<i>Stellaria media</i> Vill.	B,S,W,Sa	B,S,W	B,S,W	B,S,W	B,S,W	-
		Silenoideae	B,S,Sa	S,Sa	S	-	-	Sa
		<i>Agrostemma githago</i> L.	Sa	Sa	-	-	-	-
		<i>Dianthus barbatus</i> L.	B,S,W	B,S,W	B,S,W	B,S,W	B,S,W	-
		<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	B,S,Sa	B,S,Sa	B,S	B,S	B,S	-
		<i>Dianth. carth-</i>	B,S	B,S	B,S	B,S	B,S	-
		<i>sianorum</i> L.	Sa	Sa	-	-	-	-
		<i>Dianthus deltoides</i> L.	B,S,Sa	B,S,Sa	B,S	B,S	B,S	-
		<i>Dianthus plumarius</i> L.	B,S,Sa	B,S,Sa	B,S	B,S	S	-
		<i>Gypsophila repens</i> L.	Sa	Sa	-	-	-	Sa
		<i>Gypsophila tenuifolia</i> M.B.	B,S,Sa	B,S,Sa	B,S	B,S	B,S	Sa
		<i>Lychnis flos cuculi</i> L.	B,W,Blkn	W,Blkn	W	W,Blkn	W	-
		<i>Melandrium album</i> Garcke	Sa	Sa	-	-	-	Sa
		<i>Melandrium silvestre</i> Röhling	B,S,Sa	B,S,Sa	B,S	B,S	B,S	-
		<i>Saponaria caespitosa</i> DC.						

Tab. 3 ff.

FAMILIE	UNTERFAMILIE ODER TRIBUS	ART	UNTERSUCHTE PFLANZEN- THEILE	RAFFI- NOSE	MELI- BIOSE	LYCH- NOSE	ISO- LYCH- NOSE	STA- CHYOSE
Caryo- phyllaceae	Silenioideae	Saponaria of- ficinalis L.	B, S, W, Sa	Sa, W	-	W	W	Sa
		Silene	B, S, Sa	B, S	B, S	B, S	B, S	Sa
		silene alpestris Jacq.	B, S, Sa, W,	B, S, Sa,	B, S, W	B, S, W,	B, S, W,	B, Sa
		dioica Clairv.	Blkn	W, Blkn	-	-	Blkn	-
		Silene	Sa	Sa	-	-	-	Sa
		saxifraga L.	Sa	Sa	-	-	-	Sa
		Silene vulga- ris Garcke	Sa	-	-	-	-	Sa
		Viscaria vulga- ris Bernh.	B, S, Sa, W	B, S, W,	B, S, W	B, S, W	B, S, W	Sa
		Chenopodieae	Beta	W	-	-	-	-
		vulgaris L.	W	W	-	-	-	-
Cheno- podaceae	Chenopodieae	Chenopodium fo- liosum Asch.	Sa	Sa	Sa	-	-	Sa
		Chenopodium	B, S, W	B, S, W	-	-	-	S, W
		bonus-hen- ricus L.	-	-	-	-	-	-
		Ch. opulifolium	S, W	S, W	-	-	-	S, W
		Koch & Ziz	B	B	-	-	-	-
		Spinacia	-	-	-	-	-	-
		oleracea L.	-	-	-	-	-	-
		Aerva candens	WB, S	S	-	-	-	-
		Amaranthus	B, S	-	-	-	-	-
		caudatus L.	-	-	-	-	-	-
Didierea- ceae	Amaranthaceae	Alluaudia hum- bertii Choux	(BS)	-	-	-	-	-
		Opuntioideae	Opuntia spec.	S	-	-	-	-
		Cactaceae	Pereskioideae	-	-	-	-	-
		aculeata Miller	-	S	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-

3.3. Die physiologische Rolle der Lychnosezucker bei den Caryophyllaceen

3.3.1. Veränderung der Konzentration verschiedener Zucker bei Dianthus caryophyllus und Cerastium arvense im Jahresverlauf

Untersuchungen von Courtois an *Silene dioica*, *Silene vulgaris* und *Dianthus caryophyllus* hatten gezeigt, daß die Saccharose-galactoside vom Lychnosetyp im Herbst (November) ein Maximum erreichen und auch im Frühjahr (April bis Juni) nochmals Galactoside produziert werden. Aus den Arbeiten von Courtois geht aber nicht hervor, wann die Bildung der Galactoside erfolgt und wie lange sie unverändert gespeichert werden.

Der Jahresgang der Oligosaccharide wurde bei Blatt und Sproß von *Dianthus caryophyllus* und *Cerastium arvense* untersucht. Um tagesperiodische Schwankungen im Genalt einzelner Zucker weitgehend auszuschalten, wurden die Proben grundsätzlich zwischen 12 Uhr und 14 Uhr entnommen.

3.3.1.1. Dianthus caryophyllus

a) Dianthus caryophyllus Blatt

Bei *Dianthus caryophyllus* beträgt die Lebensdauer einer Blatt-generation ca. $1\frac{1}{4}$ Jahre. Im Herbst werden an der Spitze eines "Blattschopfes" noch Blätter gebildet, die aber nicht mehr auf ihre volle Größe heranwachsen, sondern schon nach 2-3 cm das Wachstum einstellen und in dieser Größe überwintern, während die nun ein Jahr alten Blätter im zeitigen Frühjahr zugrundegehen. Die jungen Blätter zeigen im Februar 1972 eine deutliche Zunahme von Saccharose und ihren Galactosiden, die sich bis in die zweite Märzhälfte fortsetzt (siehe Abb. 4). Die angehäuften Raffinose ist beträchtlich und erreicht in der dritten Märzwoche 7 % des Frischgewichts; ihr gegenüber treten Saccharose und Lychnose, die nur etwa $\frac{1}{10}$ des Raffinosewertes erreichen, stark in den Hintergrund. Mit dem in der letzten Märzwoche einsetzenden Temperaturanstieg (s. Abb. 5),

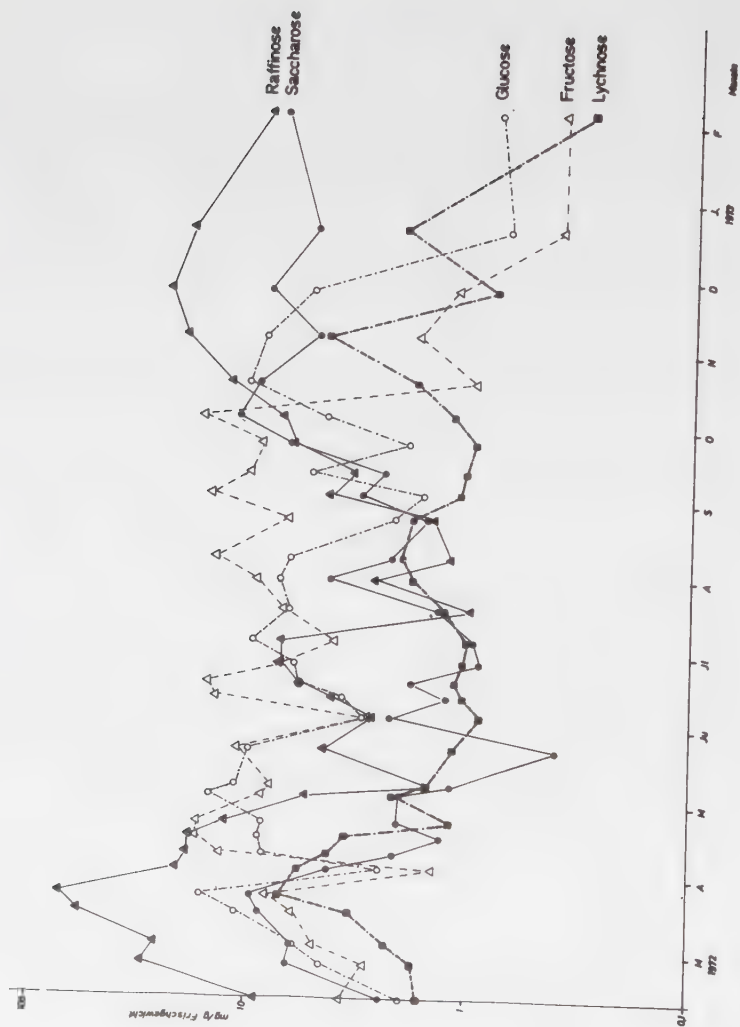


Abb. 4
Jahreszeitlicher Gang der Zucker in Blättern von *Dianthus caryophyllus*

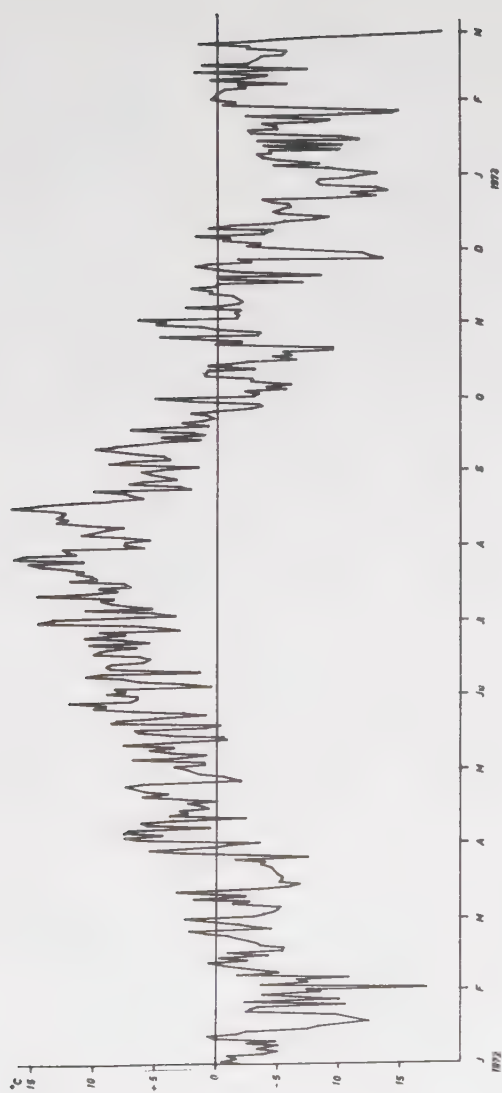


Abb. 5
Nächtliche Temperaturminimas im Jahresverlauf 1972/73

der, mit Ausnahme von zwei Tagen, von frostfreien und relativ warmen Nächten begleitet ist, setzt das Austreiben des Sprosses und der überwinterten jungen Blätter ein. Mit der Wiederaufnahme des Wachstums steht wohl das Absinken der Oligosaccharide im Zusammenhang. Die Monosaccharide zeigen nur zu Beginn der Mobilisierung der Oligosaccharide einen starken Abfall, haben aber nach acht Tagen schon wieder den ursprünglichen Wert erreicht. Von Anfang Mai bis Ende September sind dann die Monosaccharide die mengenmäßig dominierenden Zucker. Bemerkenswerterweise liegt fast den ganzen Sommer über der Fructosegehalt wesentlich über dem der Glucose, wobei im Extremfall ein Fructosewert gemessen wurde, der dem 10-fachen Glucosewert entsprach. Diese Verhältnisse stehen im deutlichen Gegensatz zu denen beim Blatt von *Cerastium arvense*, die anschließend besprochen werden. Im Herbst gehen die Monosaccharide dann wieder stark bis auf Mengen von unter 1 mg/ g Fgw zurück, die sich während des Winters kaum verändern.

Der Gehalt an Lychnose und Saccharose von 1-2 mg/ gFgw unterliegt den Sommer über nur geringen Schwankungen und ändert sich auch während der Blütezeit nur unwesentlich. Raffinose dagegen wird im Juni noch einmal schwach angereichert, verschwindet aber noch vor Einsetzen der Blüte. Wenn dann Mitte September die Nachttemperaturen bis in Gefrierpunktnähe absinken, werden in zunehmenden Maß Saccharose und Raffinose gespeichert, während der Gehalt von Lychnose deutlich verzögert ansteigt und schon nach Erreichen von ca. 7 mg/ g Fgw wieder absinkt.

In den nun ein Jahr alten Blättern werden etwa um $\frac{2}{3}$ weniger Saccharosegalactoside angereichert als von den jungen Blättern im Frühjahr, aber vermutlich wegen der niedrigen Temperaturen und der geringeren Stoffwechselaktivität werden sie wesentlich länger als im Frühjahr gespeichert. Der anschließende Rückgang im Zuckergehalt wird durch das Absterben der alten Blätter bedingt.

b) Dianthus caryophyllus Sproß

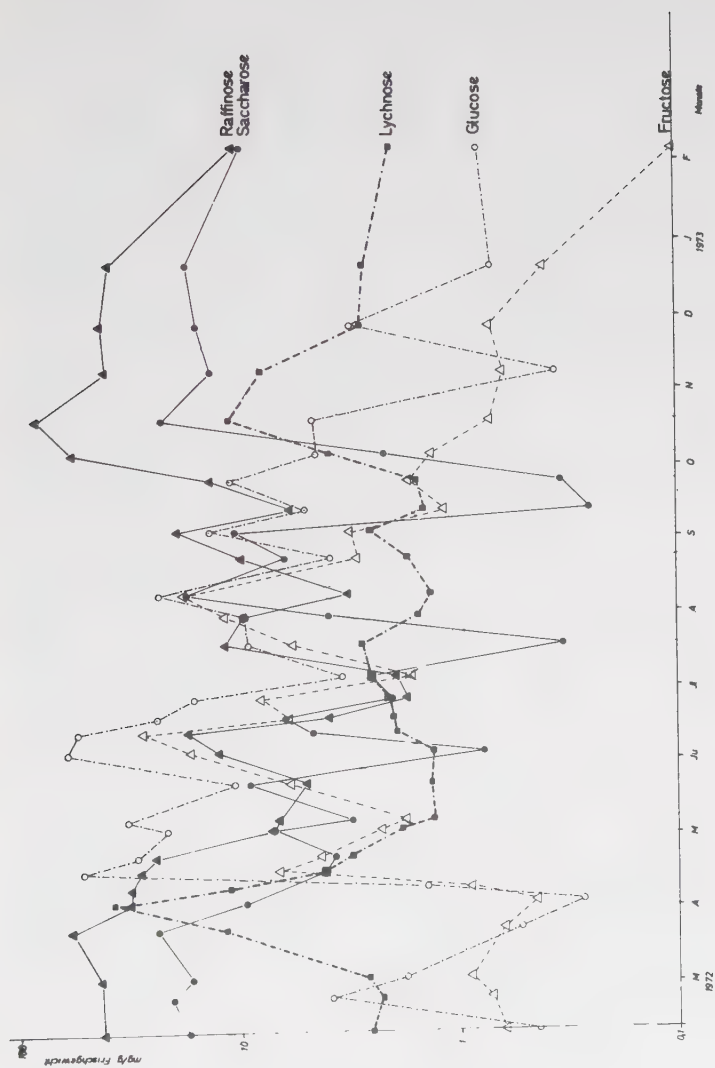


Abb. 6
Jahreszeitlicher Gang der Zucker in Sprossen von *Dianthus caryophyllus*

Zur Untersuchung des Sprosses wurde der Teil ausgewählt, der knapp unterhalb der gleichzeitig untersuchten Blätter lag. Stellt man den Jahresgang der Saccharosegalactoside in den beiden Pflanzenteilen gegenüber, so wird auch im Sproß die Anreicherung der Saccharose und ihrer Galactoside im zeitigen Frühjahr und im Herbst etwa zu den gleichen Zeiten wie im Blatt deutlich. Auch hier dominiert während der genannten Zeiträume die Raffinose über Saccharose und Lychnose. Desgleichen überwiegen während der Wachstumsperiode die Monosaccharide über die Oligosaccharide, zeigen aber im Jahresgang erhebliche Schwankungen. Dabei fällt die Fructose gegenüber der Glucose stark ab, die ihrerseits vom Frühjahr bis zum Frühsommer Werte erreicht, die mit maximal 61 mg/g Fgw etwa in der gleichen Größenordnung liegen wie die der Raffinose in der Zeit der hauptsächlichsten Galactosidanreicherung. Bemerkenswert ist, daß die Synthese der Lychnose zeitlich stark hinter der Raffinose nachhinkt und im Frühjahr Anfang April sogar noch eine starke Lychnoseproduktion stattfindet, wenn der Gehalt an Saccharose und Raffinose schon rapide abnimmt. Setzt man in dem Zeitraum vom 24.3.72 bis zum 4.4.72 die Abnahme der Saccharose um 14,4 mg und die der Raffinose um 26,7 mg mit der Zunahme der Lychnose im gleichen Zeitraum um 25,3 mg in Beziehung, wird eine Aussage über den Weg von Saccharose und Raffinose während dieser Zeit möglich. Würden die 14,4 mg Saccharose und die 26,6 mg Raffinose gänzlich in den Lychnoseaufbau eingeschleust, so müßte der Lychnosegehalt um 28,8 mg (aus der Saccharose stammend) zuzüglich 35,6 mg (aus der Raffinose stammend), in der Summe also um 64,4 mg ansteigen. Diesem theoretisch möglichem Wert von 64,4 mg steht ein tatsächlicher Lychnosezuwachs um 25,3 mg gegenüber, woraus man den Schluß ziehen kann, daß ca. 60 % von Saccharose und Raffinose effektiv abgebaut werden und nur 40 % zum Aufbau von Lychnose herangezogen werden.

Die im Herbst angehäuften Raffinose - etwa viermal so viel wie im Blatt - verschwindet aber im Gegensatz zu den Verhältnissen im Blatt relativ rasch schon vor Winterbeginn, ohne daß sich deshalb der geringe Gehalt an Monosacchariden erhöhen würde.

Eine Ableitung in tieferliegende Teile des Sprosses oder eine Umwandlung in Stärke ist deshalb zu diskutieren. Eine ähnliche Tendenz zeigen Saccharose und Lychnose.

3.3.1.2. Cerastium arvense

Beim Sproß von *Cerastium arvense* wurde zur Kontrolle der Galactosidwerte die Gesamtgalactose aus dem hydrolisierten Rohextrakt bestimmt. Im Gesamtgalactosewert ist neben der Galactose von Raffinose und Lychnose insbesondere die Galactose aus den höheren Homologen der Lychnosereihe enthalten. Daneben wird aber auch die Galactose aus völlig anderen Stoffgruppen, wie z.B. den Zuckeranteilen der Anthocyane und der Saponine erfaßt, die aber mengenmäßig keine besondere Rolle spielen dürften, da bei der Localisation der Zuckerverbindungen auf den Chromatogrammen mit Hilfe von Silbernitrat außer den untersuchten Zuckern kaum noch wesentliche Schwärzungen auftraten, die auf größere Mengen dieser Verbindungen hingewiesen hätten.

Der Jahresgang im Gesamtgalactosewert zeigt beim Sproß (Abb. 8) deutliche Schwerpunkte der Galactosidanreicherung im Frühjahr und im Herbst. Im Sommer liegt der Galactosidspiegel wesentlich niedriger, wobei in der Mitte zwischen erster und zweiter Blüte ein Zwischenmaximum auftritt.

a) *Cerastium arvense* Blatt

Ähnlich wie bei *Dianthus caryophyllus* überwintern bei *Cerastium arvense* nur die jüngsten, im Herbst angelegten Blätter, die einjährigen Blätter gehen ausnahmslos nach längeren Frostperioden zugrunde. Die noch nicht ausgewachsenen Blätter zeigen Ende Februar (siehe Abb. 7) eine starke Anhäufung von Saccha-

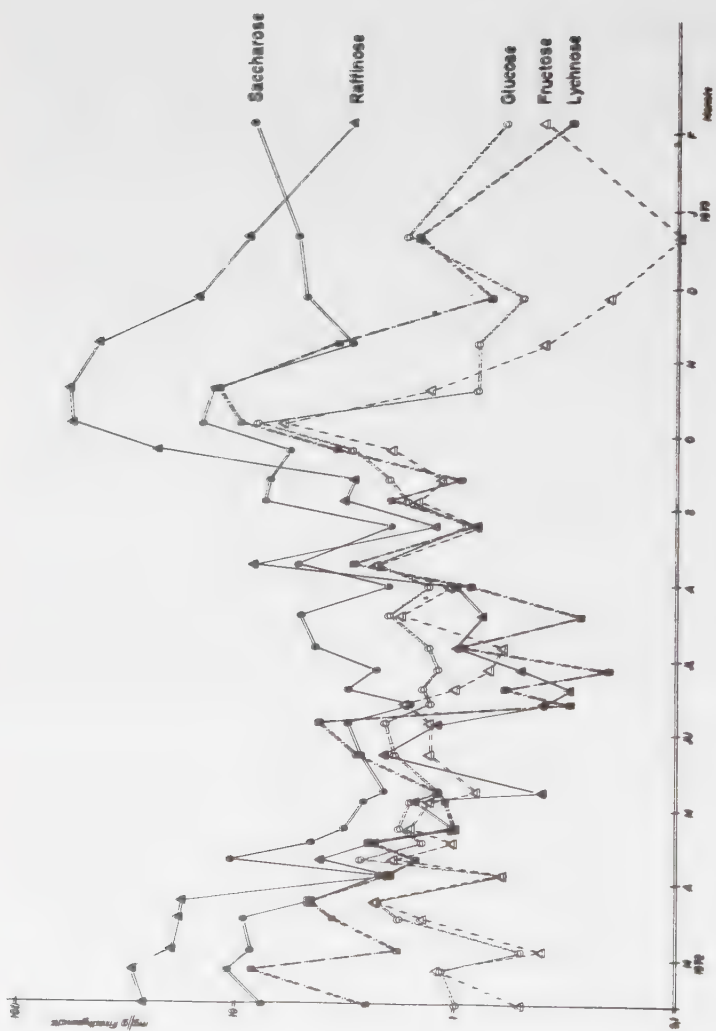


Abb. 7
Jahresseltlicher Gang der Zucker in Blättern von *Cerastium arvense*

rosegalactosiden. Von den Galactosiden überwiegt die Raffinose bei weitem. Anfang März beginnt der Abbau und bis Anfang April, etwa ein Monat vor der ersten Blüte, sind diese Galactoside in einen Bereich von ca. 1 mg/g Fgw abgesunken. In der Zeit vor der ersten Blüte ist die Saccharose der dominierende Zucker, dagegen ändert sich die Menge der Saccharosegalactoside nur geringfügig, wenn man von einer schwachen Lychnoseanhäufung im Anschluß an die erste Blüte absieht, die aber schon einen Monat später wieder verschwunden ist. Die Monosaccharide, die im Blatt von *Dianthus caryophyllus* während des Sommers die dominierenden Zucker waren, liegen beim *Cerastium*-Blatt etwa in den gleichen Mengen vor wie die Saccharosegalactoside und schwanken bis Anfang August etwa zwischen 1 und 2 mg/g Fgw. Ein Überwiegen der Fructose im Sommer wie beim Blatt von *Dianthus* findet sich beim Blatt von *Cerastium arvense* nicht, vielmehr treten beide Monosaccharide praktisch das ganze Jahr über in etwa gleicher Höhe auf.

Etwa eine Woche vor Beginn der zweiten Blüte setzt bei allen untersuchten Zuckern eine deutliche Neuproduktion ein, die aber nur von kurzer Dauer ist. Bei Blütenbeginn geht der Gehalt der einzelnen Zucker wieder auf "sommerliche" Werte zurück.

Die Zeit bis Mitte September ist gekennzeichnet von einer neuerlichen Saccharoseanhäufung, die der starken Produktion der Saccharosegalactoside von der Monatsmitte ab vorangeht. Auch hier bei *Cerastium* ist eine deutliche Korrelation zwischen dem Beginn der Galactosidsynthese und dem Absinken der nächtlichen Temperaturminimas bis in die Nähe des Gefrierpunktes erkennbar. Die intensive Galactosidproduktion hält bis gegen Ende der ersten Oktoberwoche an. Dabei erreicht die Raffinose als bei weitem überwiegender Zucker einen Pegel von ca. 6 % des Frischgewichtes; ihr gegenüber bleiben die Saccharose mit 1,5 % und die Lychnose mit 1,2 % weit zurück. Nach weiteren zwei Wochen einer stark eingeschränkten Galactosidproduktion wird der erreichte Pegel nicht etwa "eingefroren", sondern er geht wieder zurück. Die Blätter sterben dann im Februar, noch mehrere Wochen vor dem Neuaustrieb, ab.

b) Cerastium arvense Sproß

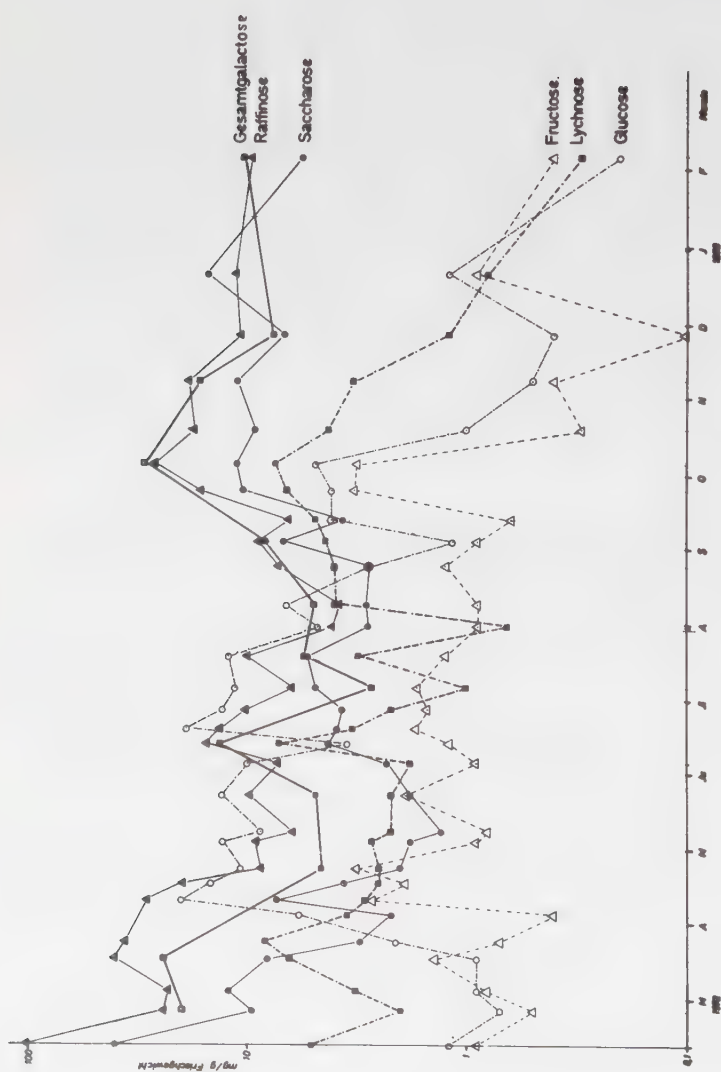


Abb. 8
Jahreszeitlicher Gang der Zucker in Sprossen von *Cerastium arvense*

Da *Cerastium arvense* nur über ein sehr schwach entwickeltes Wurzelwerk verfügt und die nur einjährigen Blätter den Winter nicht überdauern, muß die Speicherung von Reservesubstanzen vom Sproß übernommen werden. Diese Funktion des Sprosses zeigt sich deutlich bei der winterlichen Anhäufung von Saccharose und ihren Galactosiden. Raffinose als dominierender Zucker erreicht Anfang Februar einen Wert von ca. 11 % des Frischgewichtes. Setzt man dazu die starke frostbedingte Entwässerung der Pflanze in Relation, so ergibt sich für die Raffinose ein Wert von ca. 25 % des Trockengewichtes. Dieser Raffinosewert muß fast als "unwahrscheinlich hoch" bezeichnet werden. Es wäre aber durchaus denkbar, daß einmal trotz aller Bemühungen um Materialkonstanz ein Sproß mit außergewöhnlich hohem Zucker-gehalt zur Untersuchung gelangen könnte, da das Material nur nach morphologischen Kriterien ausgewählt wurde. Es wurde deshalb versucht, bei einer Entnahme durch gleichzeitige Untersuchung mehrerer Sprosse den Fehler durch sich anormal ver-naltende Pflanzenteile nach Möglichkeit kleinzuhalten. Berücksichtigt man aber neben dem hohen Saccharosewert der gleichen Entnahme mit 44 mg/g Fgw die Tatsache, daß nach chromatographischer Trennung Raffinose und Saccharose nach verschiedenen Verfahren bestimmt wurden, und im Winter Raffinose meist stark über Saccharose dominiert, so scheint ein methodischer Fehler doch weitgehend auszuschneiden. Gegenüber Raffinose und Saccharose treten die höheren Saccharosegalactoside weit zurück, eine deutliche Zunahme erfolgt erst parallel mit einer erneuten Raffinoseproduktion Anfang März. Die Galactoside werden aber nur noch kurze Zeit angehäuft und vor dem Austreiben des Sprosses beginnt ein rascher Abbau der Oligosaccharide, begleitet von einer starken Erhöhung der Monosaccharide, insbesondere der Glucose.

Stellt man den Zuckergehalt von Blatt und Sproß gegenüber, so zeigt sich, daß im Blatt die Raffinose als mengenmäßig bedeutendstes Galactosid schon Anfang April fast vollständig verschwunden ist, während zur gleichen Zeit der Abbau im Sproß noch in vollem Gange ist und erst in der letzten Woche des April beendet wird; des weiteren wird deutlich, daß im Sproß

bis in den Herbst ein wesentlich höherer Pegel an Raffinose und Lychnose erhalten bleibt als im Blatt. Zwischen der ersten und der zweiten Blüte findet im Sproß Mitte Juni noch einmal eine ausgeprägte kurzfristige Anhäufung von Saccharosegalactosiden statt. Ab Mitte August setzt dann die herbstliche Galactosidproduktion ein, wobei die stärkste Zunahme wieder in der Periode starker nächtlicher Abkühlung stattfindet. Die angehäuften Galactoside werden aber schon zu Beginn der zweiten Oktoberhälfte wieder abgebaut und bleiben im Winter auf relativ niederem, ein wenig über den Sommerwerten liegenden Niveau. Dabei überrascht, daß der Raffinosewert Anfang Februar 1973 weniger als den zehnten Teil des Wertes Anfang Februar 1972 ausmachte und auch noch keine Zunahme des Raffinoseniveaus erkennbar war. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden - möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit dem stark verspäteten Winterbeginn 1971/72.

3.3.2. Versuche zur Ableitung der Raffinose und der Lychnosezucker

Die Funktion der Saccharose als Transportzucker ist seit langem bekannt. In ausgeprägten Raffinosepflanzen wie z.B. *Lamium* kann diese Funktion überwiegend von den Saccharosegalactosiden der Raffinosereihe übernommen werden (Senser und Kandler, 1967). Dabei wird nicht etwa das Monogalactosid Raffinose, sondern das Tetrasaccharid Stachyose am besten von allen Oligosacchariden abgeleitet.

Da bei den meisten untersuchten Caryophyllaceen die Zucker der Raffinosefamilie durch die Oligosaccharide der Lychnosereihe wenigstens teilweise ersetzt sind, lag es nahe, anzunehmen, daß auch hier die Galactoside bei der Zuckerableitung bevorzugt werden. Um dies experimentell zu prüfen, wurden auf Grund später zu besprechender Photosyntheseveruche solche Caryophyllaceen verwendet, bei denen schon nach relativ kurzen Photosynthesezeiten in $^{14}\text{CO}_2$ die Lychnosezucker ausreichend markiert wurden. Die Auswahlmöglichkeit wurde dadurch stark eingeengt, daß manche Pflanzen wie *Cerastium arvense* und *Dianthus caryo-*

phyllus nur zu bestimmten Jahreszeiten Galactoside in erforderlichem Maße produzieren; bei "Rasenbildnern" wie *Stellaria media* und *Cerastium arvense* wurde die Versuchsdurchführung wegen der stark verzweigten und sehr zerbrechlichen Sprosse erschwert. Bei den *Lychnidae* liegen meist Rosettenpflanzen mit stark gestauchter Sprossachse vor, sodaß man kaum Ableitungsversuche machen kann.

Trotzdem wurde versucht, bei *Silene dioica* die Assimilatabeleitung in die Wurzel zu verfolgen. Die Versuchspflanzen wurden Anfang Januar aus dem Freiland geholt, eingetopft und im kalten Gewächshaus akklimatisiert. Da es nur schwer möglich ist, bei einer eingetopften Pflanze ohne größere Störungen mehrmals in bestimmten Zeitabständen nach der Photosynthese Wurzelproben zu entnehmen, wurde die Versuchspflanze eine Woche vor der Photosynthese in eine Nährlösung gestellt. Zum Versuch wurde die Pflanze in dem Glas mit der Nährlösung belassen, das zur Vermeidung unnötiger $^{14}\text{CO}_2$ -Verluste mit Parafilm abgedichtet wurde, und dann zur Photosynthese in einen Exsiccator gestellt. Die Nachbehandlung in Luft + $^{12}\text{CO}_2$ erfolgte ohne zusätzliche Beleuchtung. Bei jeder Entnahme wurden ein Blatt und einige Wurzeln abgeschnitten und getrennt aufgearbeitet. Nach 8 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ am 11.1.72 war, bezogen auf mg Frischgewicht, nur 0,6 % der Gesamtaktivität der löslichen Fraktion in die Wurzel gewandert. Bei der chromatographischen Analyse der geringen abgeleiteten Aktivität konnte nur Saccharose gefunden werden, was nicht ausschließt, daß Saccharosegalactoside unterhalb der Erfassungsgrenze abgeleitet wurden. 24 Std. nach Beendigung der Photosynthese wurde die zweite Probe entnommen. Der Aktivitätsanteil in der Wurzel war nunmehr auf 6,5 % gestiegen, wobei die Saccharose einen Anteil von 98,1 %, die Raffinose von 1,2 % erreichte. Eine nennenswerte Ableitung von Saccharosegalactosiden bei *Silene dioica* erscheint deshalb nicht sehr wahrscheinlich.

Bei *Cerastium arvense* wurde versucht, auf indirektem Wege Aussagen über die Natur der abgeleiteten Zuckerverbindungen zu erhalten. Bei allen, später im Detail besprochenen Photo-

syntheseversuchen wurden die relativ kleinen Blätter zur Photosynthese am Sproß belassen. Nach der Photosynthese wurden dann in getrennten Proben entweder Blätter und Sproß gemeinsam oder Blätter und Sproß getrennt aufgearbeitet. Außerdem wurde noch zur gleichen Zeit im gleichen Gefäß mit einem entsprechenden, entblätterten Sproß Photosynthese durchgeführt, um die Eigenphotosyntheserate des Sprosses und seine Fähigkeit zur Markierung von Saccharosegalactosiden abschätzen zu können. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle:

Tab. 4: Prozentuale Verteilung des C^{14} auf Sproß und Blätter von *Cerastium arvense* nach 3 Std. bzw. 6 Std. Photosynthese in $^{14}CO_2$ (15.9.1972)

3^h Photosynthese		6^h Photosynthese	
Fraktion	%-Anteil	Fraktion	%-Anteil
Sproß+Blätter	100 %	Sproß+Blätter	100 %
Blätter nach PS abgetrennt	59 %		
Sproß nach PS entblättert	41 %		
Sproß vor PS entblättert	17 %	Sproß vor PS entblättert	15 %

Setzt man die Photosyntheseleistung (cpm/mg Fgw) einer Probe, bei der Sproß und Blätter gemeinsam aufgearbeitet wurden, gleich 100 %, dann ergeben sich für den vor Versuchsbeginn

entblätterten Sproß bei 3 Std. und 6 Std. Photosynthese mit 17 bzw. 15 % annähernd gleiche Werte. Stellt man dem vor Versuchsbeginn entblätterten Sproß (3^h PS) den erst nach der Photosynthese entblätterten Sproß gegenüber, so wird hier ein bedeutender Aktivitätszuwachs (140 %) durch Assimilatableitung sichtbar.

Die Verteilung der Aktivität auf Saccharose, Raffinose und Lychnose ist in der nachfolgenden Tabelle gegeben.

Tab.5: Prozentualer Anteil einzelner Zucker am C^{14} -Gehalt des Löslichen der verschiedenen Fraktionen von *Cerastium arvense* nach 3 Std. Photosynthese (15.9.1972)

Fraktion	Saccharose	Raffinose	Lychnose
Sproß+Blätter	68,7	10,6	0,75
Blätter nach PS abgetrennt	66,2	10,2	0,74
Sproß nach PS entblättert	74,6	11,3	0,77
Sproß vor PS entblättert	63,1	5,8	0,60

Die Assimilatableitung vom Blatt in den Sproß führt demnach im Sproß zu einer leichten Erhöhung der Markierung von Saccharose und Raffinose gegenüber anderen Verbindungen, während im von Anfang an entblätterten Sproß bei etwa gleichem Anteil von Saccharose und Lychnose der Raffinosepegel um etwa 50 % niedriger ist.

Vergleicht man die ^{14}C -Anteile der drei Zucker Saccharose, Raffinose und Lychnose untereinander, indem man ihre Summe gleich 100 % setzt, so stellt man fest, wie Tab. 6 zeigt, daß in Blättern und Sproß, die erst nach der Photosynthese getrennt wurden, die gleiche Aktivitätsverteilung zwischen

Saccharose, Raffinose und Lychnose vorliegt.

Tab. 6: Prozentuale Verteilung der Aktivität innerhalb der Oligosaccharide bei *Cerastium arvense* nach 3 Std. Photosynthese (15.9.1972). Oligosaccharidfraktion = 100 %.

Fraktion	Saccharose	Raffinose	Lychnose
Sproß+Blätter	85,8	13,2	1,0
Blätter nach PS abgetrennt	85,8	13,2	1,0
Sproß nach PS entblättert	86,1	13,0	0,9
Sproß vor PS entblättert	90,8	8,3	0,9

Da in dem vor der Photosynthese entblätterten Sproß Raffinose nur in viel geringerem Maße markiert wird, ist anzunehmen, daß an dem vergleichsweise hohen Raffinosewert des nach der Photosynthese entblätterten Sprosses die Ableitung markierter Verbindungen aus den Blättern maßgeblich beteiligt ist.

Nun sagt aber eine erhöhte Markierung in der Raffinose noch nicht aus, daß Raffinose selbst abgeleitet wird, denn sie könnte auch erst im Sproß aus abgeleiteter Saccharose gebildet werden. Die intramolekulare Verteilung in der Raffinose sollte nun darüber Aufschluß geben. Wie aus Tab. 7 hervorgeht, weist die im Blatt gebildete Raffinose schon Gleichverteilung auf. Bei dem vor Photosynthesebeginn entblätterten Sproß ist dagegen der Galactoseanteil in der Raffinose wesentlich schlechter markiert. Würde nun neben der Saccharose auch noch Raffinose aus dem Blatt in den Sproß abgeleitet werden, so müßte das Gemisch der im Sproß selbst gebildeten und der abgeleiteten Raffinose für den Galactoseanteil eine Markierung

lisierbare Fraktion) verwendet. Schon nach 30 min Photosynthese ist elfmal mehr an Aktivität in den Rückstand eingebaut worden als in das Hydrolysat. Nach 6 Std. liegen 12,5 % der Gesamtaktivität im Rückstand vor und dieser Anteil erhöht sich während der Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ auf fast 50 %.

Am 7.9. wird mit maximal 0,9 % etwas mehr Aktivität in das Hydrolysat eingebaut. Der Anteil des Rückstandes ist gegenüber dem Maiversuch sogar noch einmal deutlich erhöht und erreicht am Ende der 18-stündigen Nachbelichtung fast 70 % der Gesamtfixierung.

Schon eine Woche später, am 15.9.1972, hat sich die Art der Assimilatverwertung grundlegend gewandelt. Das Hauptgewicht hat sich auf die Synthese der Speichersubstanzen verlagert, die nach 30 min schon 29,3 % der Gesamtfixierung enthalten, gegenüber 0,3 % bei gleicher Photosynthesezeit am 7.9.72. Bei längeren Photosynthesezeiten steigt der Anteil des Hydrolysats fast ebenso stark an, wie der Anteil des Löslichen abnimmt. Nach 6 Std. finden sich dann nur noch 25,3 % in der löslichen Fraktion. Da ihr ohnehin schon geringer Anteil während der Verdrängungsperiode nur mehr schwach auf 19,5 % absinkt, verändern sich auch die Anteile von Hydrolysat und Rückstand nur noch unwesentlich.

Das Hydrolysat wurde chromatographisch analysiert. Bei den Photosyntheseversuchen vom 23.5.72 und 7.9.72 fand sich der größte Teil der Aktivität in der Glucose, die als Hydrolysenprodukt der Stärke aufzufassen ist. Daneben trat bei längeren Photosynthesezeiten noch eine stark markierte, unbekannte Verbindung auf, bei der es sich auf Grund fehlender Fluoreszenz im UV, auch nach Bedampfen mit Ammoniak, wohl nicht um einen Phenolkörper handeln dürfte, an den wegen seiner Laufstrecke in der Chromatographie zu denken war. Am 15.9.72 fehlte diese unbekannte Verbindung. Galactose wurde neben der immer noch dominierenden Glucose zu einem wesentlichen Bestandteil des Hydrolysats, in dem noch größere Mengen an markierter Arabinose und Xylose auffielen. Im Herbst liegt also bei *Cerastium arvense*

ein ganzes Spektrum von Reservepolysacchariden vor, dem neben Stärke und Saccharosegalactosiden noch verschiedene andere Polymere angehören.

Auch bei zwei Photosyntheseversuchen mit *Stellaria media* am 23.5.1972 und am 7.10.1971 wurde das Hydrolysat analysiert. Die Ergebnisse vom 23.5.72 sind mit denen von *Cerastium* am gleichen Tag sowie die des 7.10.1971 mit denen vom 15.9.1972 bei *Cerastium* weitgehend identisch.

3.4.1.1.2. Bildungskinetik der Saccharosegalactoside

An Hand der einzelnen Bildungskinetiken im Jahresverlauf sollte nun untersucht werden, ob aus den Markierungsmustern der Galactoside Rückschlüsse auf ihre Biosynthese möglich sind.

Zunächst sei vorweggenommen, daß etwa bei der Hälfte der Photosyntheseversuche die Gesamtfixierung der 6-Std.-Versuche deutlich niedriger war als die 3-Std.-Versuche oder nur eine schwache Zunahme zeigte. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß einzelne Pflanzen nicht während der ganzen Photosynthesezeit die Spaltöffnungen offenhalten, sondern sie schon längere Zeit vor Ende des Versuches verschließen; dann wäre kein weiterer $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau mehr, sondern nur noch eine Verschiebung des bereits assimilierten $^{14}\text{CO}_2$ zwischen verschiedenen Verbindungen möglich. Ein Aktivitätsverlust könnte durch Veratmung markierter Verbindungen entstehen.

Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, dominierte die Saccharose während des ganzen Jahres bis zu einer Photosynthesezeit von 6 Std. über alle anderen Zucker. Dagegen durchlief, deutlich von der Jahreszeit abhängig, die Markierung der Saccharosegalactoside im Herbst von Anfang September bis Mitte November und im Frühjahr von Ende Februar bis Mitte April ein Maximum. Über die Zeit von Ende November bis Ende Februar liegen bei *Cerastium arvense* mangels Versuchen keine Angaben über die Stärke der Galactosidmarkierung vor. Allerdings scheinen nach den Ergeb-

ergeben, die zwischen den Werten der nach dem Versuch abgetrennten Blätter und des vor der Photosynthese entblätterten Sprosses läge. Dies ist aber nicht der Fall und deshalb erscheint eine nennenswerte Ableitung von Raffinose neben Saccharose nicht sehr wahrscheinlich.

Tab. 7: Prozentuale Aktivitätsverteilung in der Raffinose nach 3 Std. Photosynthese bei *Cerastium arvense* (15.9.1972)

Fraktion	Galactose	Glucose	Fructose
Blätter nach PS abgetrennt	33,4	33,6	33,0
Sproß nach PS entblättert	21,4	39,8	38,8
Sproß vor PS entblättert	25,1	37,8	37,1

Es scheint vielmehr so zu sein, daß aus der in großen Mengen abgeleiteten Saccharose im Sproß entweder de novo Raffinose synthetisiert wird, oder wie später noch eingehender zu besprechen sein wird, nur eine Austauschreaktion zwischen der abgeleiteten Saccharose und der im Sproß vorliegenden Raffinose in deren Saccharoseanteil erfolgt. Eine Ableitung von Ljchnose, wie sie für die Stachyose von Senser und Kandler 1967 bei *Lamium maculatum* beschrieben wurde, erscheint nach den Ergebnissen der Tabellen 5 und 6 unwahrscheinlich.

Bei *Herniaria glabra* konnte am 26.7.72 die Zuckerableitung im Sproß über eine längere Transportstrecke verfolgt werden. Die Versuchspflanze wurde zwei Wochen vor Versuchsbeginn im Freiland ausgegraben und eingetopft, bis zum Versuch aber im Freien belassen. Um eine ausreichende Markierung der Saccharosegalactoside zu erhalten, wurde eine 6-stündige Photosyntheseperiode in $^{14}\text{CO}_2$ gewählt. Hierzu wurden die beblätterten Enden von drei verschiedenen Sprossen (Länge 20-30 mm) in einen

PVC-Beutel eingeführt und die Durchführungsstelle mit Knetwachs abgedichtet. Die außerhalb des Beutels liegenden Sproßteile wurden entblättert, um eine Verdünnung der markierten Verbindungen durch Photosynthese in $^{12}\text{CO}_2$ zu unterbinden.

Die drei Sprosse wurden erst nach 6 Std. Photosynthese und 6-bzw. 18-stündiger Nachverdunklung in Luft + $^{12}\text{CO}_2$ von der Mutterpflanze abgetrennt. Eine artificielle Stoffanreicherung und eventuell daraus folgende Hemmung des Transportes sollte auf diese Weise vermieden werden. Dann wurden die Sprosse so zerschnitten, daß jedes Stück zwei Nodien und zwei Internodien umfaßte.

Die Aktivitätsverteilung auf die aufeinanderfolgenden Sproßstücke zeigt Abb. 9. Nach 6 Std. Photosynthese liegen noch 90 % der Aktivität im apicalen Sproßabschnitt; der Aktivitätsabfall im gleichen Abschnitt auf 83,2 % nach 6 Std. und auf 85,5 % nach 18 Std. Nachverdunklung macht deutlich, daß insgesamt nur wenig Assimilate abgeleitet werden. Der Rückgang der Aktivitäten in dem außerhalb des PVC-Beutels gelegenen Sproßstück ist bei den drei Versuchen gleich hoch. Das bedeutet, daß in diesem Bereich die Leitungsbahnen mit Assimilaten schon nach der 6-stündigen Photosynthese gesättigt sind. Erst in den tiefer liegenden Abschnitten treten Sättigungsunterschiede auf. So steigt nach 220 mm Transportstrecke der Aktivitätsanteil von 0,1 % bei 6 Std. auf 0,3 % bei 6-stündiger und 1,3 % nach 18-stündiger Nachbehandlung an.

Die Verteilung der Aktivität auf die am stärksten markierten Oligosaccharide ist in der Tabelle 8 gegeben.

Nach 6 Std. Photosynthese stellt die Saccharose den größten Teil der abgeleiteten Oligosaccharide. Raffinose und die hier gemeinsam vorliegenden Tetrasaccharide Stachyose und Lychnose treten in der Markierung hinter der Saccharose stark zurück.

Im Laufe der Nachbehandlung sinkt dann im Abschnitt 1 der Anteil der Saccharose, bedingt durch Ableitung und Einbau in Raffinose und die höheren Galactoside. Nachdem eingangs fest-

gestellt worden war, daß insgesamt nur eine geringe Ableitung erfolgt, dürfte der Einbau der Saccharose in die Galactoside in erster Linie für die Abnahme der Saccharose verantwortlich sein. Das zeigt sich besonders deutlich nach 18 Std. Nachverdunkelung, wo im Sproßabschnitt 1 die Raffinose die Saccharose in der Markierung bereits überholt hat.

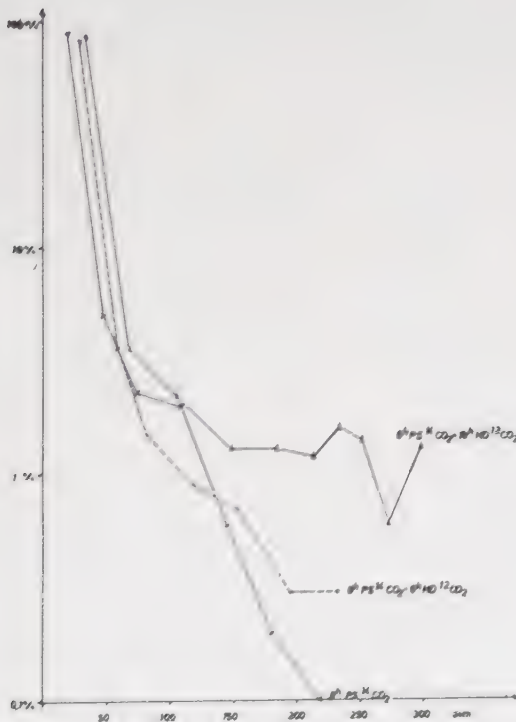


Abb. 9:

Zuckerableitung bei *Herniaria glabra*:

Prozentuale Verteilung der Aktivität in der löslichen Fraktion auf die aufeinanderfolgenden Sproßabschnitte

Tab. 8: Verteilung der Aktivität in den einzelnen Sproßabschnitten auf Saccharose, Raffinose, Lychnose und Stachyose (Summe = 100 % gesetzt) bei *Herniaria glabra*

Sproßabschnitt	^{6h} Photosynthese			^{6h} PS+ ^{6h} Nachbehandl.			^{6h} PS+ ^{18h} Nachbehandl.		
	Sacch	Raff	Lychn+ Stach	Sacch	Raff	Lychn+ Stach	Sacch	Raff	Lychn+ Stach
1	67,3	31,4	1,3	50,6	43,4	6,0	36,3	53,6	12,1
2	90,7	9,0	0,3	93,6	5,4	1,0	90,8	7,6	1,6
3	95,8	4,2	0	96,1	3,5	0,4	93,6	4,9	1,5
4	96,5	3,5	0	97,1	2,9	0	94,8	4,3	0,9
5	96,7	3,3	0	98,0	2,0	0	95,3	3,9	0,8
6	97,6	2,4	0	99,2	0,8	0	96,1	3,5	0,4
7	100,C	0	0	100,0	0	0	96,6	3,1	0,3
8							98,2	1,8	0
9							98,3	1,7	0
10							98,3	1,7	0

Mit zunehmender Nachbehandlungszeit treten in immer tiefer liegenden Abschnitten markierte Raffinose und Tetrasaccharide auf. Da aber die Markierung der Galactoside, etwa die der Raffinose, nicht nur durch Ableitung sondern auch durch Neusynthese im Sproß aus der abgeleiteten Saccharose und durch den Austausch Saccharose $\longleftrightarrow$ Raffinose zustande kommen kann, wurde die intramolekulare Aktivitätsverteilung in der Raffinose analysiert.

Tab. 9: Intramolekulare Aktivitätsverteilung in der Raffinose des obersten Sproßabschnittes von *Herniaria glabra* in %

PS - Zeit	Galactose	Glucose	Fructose
6 ^h PS	18,5	41,8	39,7
6 ^h PS + 6 ^h ND	18,9	39,7	41,4
6 ^h PS + 18 ^h ND	31,7	35,6	32,7

Nach 6 Std. Photosynthese finden sich in der Galactose der Raffinose nur 18,5 % der Gesamtaktivität des Moleküls. Dieser für sechsstündige Photosynthese niedrige Wert sagt aus, daß sogar im obersten Stengelabschnitt die Raffinose bevorzugt durch Saccharoseaustausch markiert wird. In den tieferliegenden Sproßabschnitten wurde eine weitere Aktivitätsaufnahme in der Raffinosegalactose festgestellt; eine wesentliche Neusynthese scheint deshalb im Sproß nicht stattzufinden und die beobachtete Markierung in tieferen Stengelabschnitten scheint fast ausschließlich durch Saccharoseaustausch zu erfolgen.

Nach den Ergebnissen der Untersuchung von drei Pflanzen aus verschiedenen Unterfamilien liegt der Schluß nahe, daß bei

der Zuckerableitung der Caryophyllaceen neben der Saccharose die Saccharosegalactoside keine nennenswerte Bedeutung besitzen.

3.4. Untersuchungen zur Biosynthese der Raffinose und der Lychnosezucker

3.4.1. Kinetik der ^{14}C -Verteilung während der Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$

Die über das Jahr verteilten Photosyntheseversuche in $^{14}\text{CO}_2$ sollten nun zeigen, wie schnell und in welcher Reihenfolge die Galactoside der Saccharose markiert werden und ob ein Einfluß der Jahreszeit feststellbar ist. Außerdem sollte geprüft werden, ob während der Photosyntheseperiode unbekannte Galactoside auftreten, die bei der Biosynthese der Lychnosezucker als Galactosyldonatoren fungieren könnten. Zusätzlich sollte der Vergleich der intramolekularen Aktivitätsverteilung von Raffinose und Lychnose Hinweise auf das Acceptor-molekül bei der Lychnosesynthese erbringen.

Bei kleinblättrigen Caryophyllaceen (*Cerastium*, *Stellaria*, *Herniaria*) wurden jeweils 2-3 etwa 3-4 cm lange endständige, beblätterte Sproßabschnitte in der Assimilationskammer gleichzeitig belichtet und zu den jeweiligen Zeiten ein Sproß herausgenommen. Bei allen anderen Pflanzen wurde für jede Probe nur ein Blatt verwendet. Im Falle schmaler Blätter (*Dianthus spec.*, *Lychnis flos cuculi*, *Viscaria vulgaris*) wurden alle Proben gleichzeitig in die Kammer gestellt; nach den entsprechenden Zeiten wurde jeweils ein Blatt herausgenommen und extrahiert. Bei größeren Blättern wurden nur 2-3 Blätter gleichzeitig verwendet.

Die Versuche wurden jeweils vormittags ausgeführt. Bei längeren Photosynthesezeiten lag das Ende zwischen 16 und 17 Uhr. Während der Verdrängungsperiode in $^{12}\text{CO}_2$ wurde die Lichtstärke von ca. 20 000 Lux auf etwa die Hälfte reduziert und normale Zimmerluft

durch die Assimilationskammer gepumpt. Die Luft wurde durch eine 15 %ige Schwefelsäure geleitet, die eine konstante Luftfeuchtigkeit von ca. 70 % gewährleistete und das Verdunsten des Bodenwassers in der Kammer verminderte.

Bei den kleinblättrigen Caryophyllaceen wurde am Ende der Photosyntheseperiode der Sproß mit den Blättern gemeinsam extrahiert, da nach den Ergebnissen der Ableitungsversuche die in den Sproß abgeleiteten und die dort selbst während der Photosynthese gebildeten Assimilate bei gemeinsamer Extraktion die vom Blatt allein erhaltenen Werte nur geringfügig verändern.

3.4.1.1. Cerastium arvense

Cerastium arvense schien, Stichproben nach zu schließen, unter den Caryophyllaceen eine von den Pflanzen zu sein, bei denen Lychnosezucker bei Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ relativ rasch markiert werden. Es eignet sich deshalb besonders gut, die innerhalb eines Jahres mehrmals wechselnde Syntheseaktivität für Saccharosegalactoside zu untersuchen.

3.4.1.1.1. ^{14}C -Verteilung nach verschieden langen Photosynthesepersonen zu verschiedenen Jahreszeiten

Zwei Wochen nach Blütenbeginn am 23.5.1972, in der Anlaufphase der herbstlichen Galactosidproduktion am 7.9.1972 und am 15.9.1972 wurde die Verteilung des assimilierten ^{14}C zwischen dem löslichen Anteil, dem Hydrolysat (Stärke, höhere Oligosaccharide, Hemicellulosen u.a.) und dem Unhydrolyisierbaren (Zellwandbestandteile, Lipide, Proteine) untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt (s. S. 50). Ende Mai werden mit maximal 0,4 % der Gesamtfixierung nur sehr wenig Reservekohlenhydrate synthetisiert; dagegen werden große Mengen von Assimilaten zum Aufbau von Gerüstsubstanzen (unhydro-

Tab. 10: Verteilung des ^{14}C nach verschiedenen langer Photosynthese in Luft + $^{14}\text{CO}_2$ bei Cerastium arvense.

Verteilung der Radioaktivität auf äthanollösliche Fraktion, Hydrolysat und Rückstand in % zu verschiedenen Jahreszeiten.

Datum	PS - Zeit	Gesamtfix. pro mg Fgw in μCi	% - Verteilung der Gesamtfixierung auf Äthanollösl. Hydrolysat Rückstand Fraktion	
23.5.1972	30 min	0,58	95,2	4,4
	3 ^h	3,91	91,7	8,2
	6 ^h	3,03	87,3	12,5
	6 ^h +18 ^h N	2,48	51,4	48,4
7.9.1972	30 min	0,29	86,9	12,8
	3 ^h	0,91	79,3	19,8
	6 ^h	1,24	81,3	18,1
	6 ^h +18 ^h N	1,59	31,3	68,0
15.9.1972	30 min	0,67	54,6	16,1
	3 ^h	3,43	35,0	22,0
	6 ^h	5,40	25,3	21,5
	6 ^h +18 ^h N	7,09	19,5	26,7

nissen von Verdrängungsversuchen mit *Silene dioica* und *Dianthus caryophyllus* am 11.1.1971 die Saccharosegalactoside bei den Caryophyllaceen auch in der Frostperiode relativ stark markiert zu werden. Ob ein hoher Markierungsanteil während dieser Zeit aber mit einer Nettosynthese korreliert ist, erscheint nach den Ergebnissen des Jahresganges der Oligosaccharide bei *Cerastium* sehr zweifelhaft.

Tab. 11: Prozentualer Anteil verschiedener Oligosaccharide und Galactinol am ^{14}C -Gehalt der löslichen Fraktion und intramolekulare ^{14}C -Verteilung in Raffinose und Lychnose in %

Objekt	Datum	PS - Zeit	¹⁴ CO ₂ -Fixierung (Lös1. Fraktion) cpm · 10 ³ /mg Fgw	Saccharose			Raffinose			Lychnose			Iso-Lychnose		Galac- tinol
				%-Anteil	%-Anteil	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	
Ceraat. arv.	20.2.1973	3 ^h	328	76,8	5,8	27,6	37,3	35,1	0,9				0,4		0,2
		6 ^h	587	62,9	21,2	21,7	26,9	29,4	2,8				0,9		0,3
		6 ^h +	794	32,2	23,0	23,6	37,4	39,0	13,7				2,3		0,2
		18 ^{hN}													
Ceraat. arv.	18.4.1972	30'	804	63,1	1,2	0	52,1	47,9	0				0		0
		60'	3439	76,5	1,0	0	51,4	48,6	0				0		0
		3 ^h	5556	67,9	3,6	7,4	45,4	47,2	0,1				0,1		0,1
		6 ^h	3795	56,2	1,4	17,7	40,3	42,0	0,1				0		0,1
Ceraat. arv.	23.5.1972	6 ^h +	1794	23,7	10,7	21,5	39,9	38,6	2,5	19	32	33	16	0,5	0,2
		18 ^{hN}													
		30'	1229	83,4	0,8	20,3	40,5	39,2							0,1
		60'	1989	80,2	1,9	17,3	41,6	41,1							0,2
Ceraat. arv.	23.5.1972	3 ^h	7954	72,0	2,2	18,8	40,6	40,6	0,1	25,5	32,5	33,9	8,1	0,04	0,2

Objekt	Datum	PS - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Lösl.-Fraktion) cpm·10 ³ /mg Fgw	Saccha- rose		Raffinose			Lychnose				Iso- Lychnose		Galac- tinol
				%-Anteil	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	%-Anteil	
Ger. arv.	23.5.72	6 ^h	5878	54,7	2,1	21,4	38,6	40,0	0,1	23,6	32,4	31,8	12,2	0,3	0,1
		6 ^h +	2826	20,4	8,6	22,7	40,0	37,3	2,4	21,9	35,1	31,1	11,9	0,4	0,2
		18 ^{hN}													
Ger. arv.	29.5.72	6 ^h	6361	48,8	4,1	28,9	34,5	36,6	0,2	23,1	32,2	29,0	15,7	0	0,1
		6 ^h +	2335	17,3	5,2	27,3	35,3	37,4	2,3	21,9	30,2	28,7	17,2	0,6	0,2
		18 ^{hN}													
Ger. arv.	11.8.72	30'	299	69,5	0,1										0,03
		60'	712	66,7	0,2										0,05
		3 ^h	4569	47,3	0,5	15,4	42,3	42,3							
		6 ^h	6463	67,7	1,9	24,5	39,0	36,5	0,1						
Ger. arv.	7.9.72	30'	551	79,5	2,4	14,8	42,1	43,1							0,07
		60'	640	76,1	1,9	26,8	36,9	36,3	0,1	56,3	18,8	18,1	6,8	0	0,08
		3 ^h	1611	59,0	4,4	21,2	38,6	40,2	0,3	36,1	29,6	27,4	6,9	0,1	0,06

Tab. 11 ff.

Objekt	Datum	PS - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Isol.-Fraktion) cpm·10 ³ /mg Frw	Saccharose		Raffinose		Lychnose				Iso-Lychnose		Galac- tinol	
				%-Anteil	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal		%-Anteil
Cerast. arv.	7.9.1972	6 ^h	2235	65,5	7,6	25,8	36,8	37,4	0,8	29,2	29,2	32,2	9,4	0,2	0,2
		6 ^h _N	1106	44,9	11,5	32,0	34,6	33,4	6,5	31,8	21,2	23,4	23,6	1,2	0,1
		18 ^h _N													
		30'	815	51,6	1,3	33,9	32,1	34,0	0,01						0,07
		60'	1299	70,6	10,0	25,6	36,2	38,2	0,5	42,8	21,8	21,8	13,6	0,2	0,4
Cerast. arv.	15.9.1972	3 ^h	2663	75,5	9,5	28,7	35,0	36,3	0,8	39,3	22,5	25,2	14,0	0,3	0,2
		6 ^h	3028	75,3	3,7	26,1	36,0	37,9	0,3	27,6	27,2	31,1	14,1	0,1	0,1
		6 ^h _N	3064	41,0	15,0	24,9	36,4	38,7	9,5	20,2	31,3	32,1	16,4	2,7	0,2
		18 ^h _N													
Cerast. arv.	18.10.1971	60'	181	32,3	10,3	29,7	34,6	35,7	0,2					0,1	0,7
		3 ^h	489	63,3	5,1	27,5	36,1	36,4	0,7	54,7	20,5	18,0	6,8	0,2	0,2
		6 ^h	767	58,5	7,3	17,9	40,1	42,0	1,7	38,6	24,6	22,4	14,4	0,5	0,1
		6 ^h _N	304	28,7	13,8	19,6	39,2	41,2	11,6	30,9	29,1	32,0	8,0	2,3	0,3
		18 ^h _N													

Tab. 11 ff.

Objekt	Datum	PS - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Lösli.-Fraktion) cpm · 10 ³ /mg Frw	Saccharose			Raffinose			Lychnose			Iso- Lychnose	Galac- tinol
				%-Anteil	Gal	Glu	Fru	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	%-Anteil	%-Anteil
Cerasatium arvense 21.11.1972		5'	231	56,3	3,5	0	48,6	51,4						0,3
		10'	684	70,9	2,3	4,5	46,9	48,6						0,1
		20'	888	44,8	4,6	8,0	45,4	46,6						0,3
		30'	2478	71,8	4,2	6,3	46,3	47,4						0,2
		60'	3580	69,7	10,9	6,8	46,3	46,9	0,3				0,2	0,2
		3 ^h	22981	66,2	16,9	13,8	42,5	43,7	0,4				0,3	0,3
		6 ^h	24134	51,1	24,2	16,8	46,4	46,8	3,2				1,1	0,2
		6 ^h +	31146	36,0	18,8	14,8	42,1	43,1	7,5				1,2	0,1
		18 ^h												

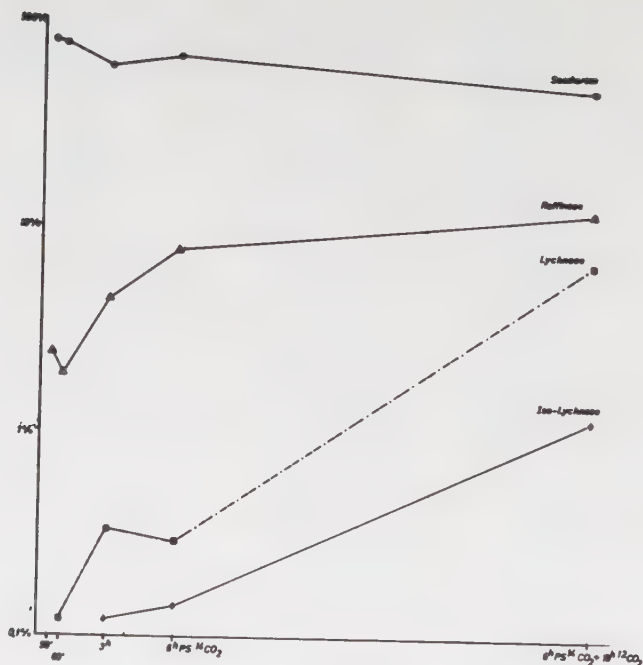


Abb. 10

Prozentualer Anteil der Oligosaccharide an der Aktivität der löslichen Fraktion bei *Cerastium arvense* am 7.9.72 in Abhängigkeit von der Photosynthesedauer

Innerhalb eines Versuchs und weitgehend unabhängig von der Photosynthesedauer in $^{14}\text{CO}_2$ sank der Markierungsanteil von Raffinose über Lychnose zu den höheren Lychnosegalactosiden immer weiter ab. Dementsprechend wurde, wie Abb. 10 zeigt, bei Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ von den Galactosiden zuerst Raffinose markiert, gefolgt von Lychnose, Isolychnose und den jeweils um eine Galactose verlängerten Molekülen. Alle Saccharosegalactoside erreichten in der Nachbelichtungszeit in $^{12}\text{CO}_2$ ihren höchsten Aktivitätsanteil, während Saccharose in dieser Zeit bis zu 50 % ihrer nach 6 Std. erreichten Aktivität verlor. Die oben beschriebenen Verhältnisse sind auch deutlich auf den Abbildungen 11a - f zu erkennen.

Tab. 12: Markierungsanteil in % des Gesamtlöslichen von Melibiose, Iso-Planteose, Raffinose und Lychnose nach 6 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ und 18 Std. Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ bei *Cerastium arvense*

Datum	Melibiose	Iso- Planteose	Raffinose	Lychnose
20.3.73	0,15	-	23,0	13,7
18.4.72	0,46	0,39	10,7	2,5
12.5.72	0,42	-	2,6	0,9
23.5.72	1,00	-	8,6	2,4
7.9.72	0,47	-	11,5	6,5
15.9.73	0,34	1,40	15,0	9,5
21.11.72	0,30	3,00	18,8	7,5

^{14}C -markierte Melibiose trat in Kinetiken bei *Cerastium* frühestens nach 6 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ auf. Auch sie erreichte wie die Saccharosegalactoside ihre maximale Markierung während der Verdrängungsperiode in $^{12}\text{CO}_2$ (siehe Tab. 12). Auf Grund der Abfolge in der Markierungskinetik, stets viel später als Raffinose und Lychnose auftretend, scheidet die Melibiose als Vorläufer bei der Synthese von Saccharosegalactosiden aus. Vielmehr dürfte es sich um ein Abbauprodukt dieser Oligosaccharide handeln.

Auch die Iso-Planteose tritt in einer Kinetik stets deutlich später und in viel schwächerer Markierung als Raffinose und Lychnose auf. Sie stellt deshalb wohl keinen Galactoseacceptor bei der Lychnosesynthese dar, sondern auch nur ein durch α -Galactosidasen entstehendes Abbauprodukt der Lychnose (siehe Tab. 12).

Bei allen Photosyntheseversuchen trat auch markiertes Galactinol auf (siehe Tab. 11). Nach den Ergebnissen von Sender und Kandler (1967) war für eine starke Raffinosemarkierung auch ein hoher Aktivitätsanteil des Galactinols zu erwarten, der bei Photosynthesezeiten bis zu 60 min und länger deutlich über dem Anteil von Raffinose und Stachyose liegt.

Ähnliche Verhältnisse konnten bei den Caryophyllaceen nicht festgestellt werden. Mit Ausnahme eines einzigen Versuchs (*Stellaria media*, 7.3.1972) erreichte aber Galactinol niemals, auch nicht nach kurzen Photosynthesezeiten, 1 % der Aktivität des Gesamtlöslichen. Diesen geringen Galactinolanteilen stand oft eine erstaunliche Raffinosemarkierung gegenüber (z.B. *Cerastium arvense*, 15.9.1972, 60 min Photosynthese: 0,36 % Galactinol / 10,0 % Raffinose). Eine Beziehung zwischen Galactinol und der Raffinosesynthese bei den untersuchten Caryophyllaceen erscheint deshalb nach den Ergebnissen der Photosyntheseversuche fraglich.

3.4.1.1.3. Intramolekulare Aktivitätsverteilung in Raffinose und Lychnose

3.4.1.1.3.1. Raffinose

Die Analyse der intramolekularen Aktivitätsverteilung ergab ein überraschendes Bild. Während analog zu Sender und Kandler (1967) in der Raffinose eine stark markierte Galactose zu erwarten war, war es hier gerade umgekehrt. So konnte am 18.4.72 bei kürzeren Photosynthesezeiten als 3 Std. überhaupt keine Aktivität im Galactoseanteil der Raffinose gefunden werden. Erst dann erschien eine schwache Markierung. Sie stieg zwar noch weiter an, erreichte aber nicht einmal nach 18 Std. Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ das Niveau von Glucose und Fructose, die nach dieser Zeit 79,5 % des ^{14}C -Gehalts der Raffinose auf sich vereinigen.

Tab. 13: Prozentualer Anteil verschiedener Oligosaccharide und Galactinol am ^{14}C -Gehalt der löslichen Fraktion und intramolekulare ^{14}C -Verteilung in der Raffinose in %

Objekt Datum	PS - Zeit	Saccha- rose		Raffinose			Sta- chyose	Galac- tinol
		%-Anteil	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	%-Anteil	%-Anteil
Lam.alb. 7.9.72	30'	11,8	3,1	38,7	29,0	32,3	15,1	20,3
	3 ^h	15,7	11,9	33,2	31,1	35,7	23,8	9,5
Tax.bacc. Budd. 22.11.72	3'	33,2	4,5	84,8	6,7	8,5	2,1	6,2
	5'	21,1	4,7	88,7	5,6	5,7	2,2	6,4
	10'	82,5	0,9	56,1	24,3	25,6	0	3,6
Fuchs.sp. 25.8.1967	30'	27,6	7,1	18,9	41,4	39,7	14,3	9,5
	5'	4,9	1,0	64,1	19,2	16,7	1,5	7,1
	30'	35,5	3,8	39,5	28,3	32,2	10,1	14,8
Cat.big.	10'	47,6	3,8	54,7	24,2	21,1	4,3	12,7
	20'	57,8	5,6	41,3	28,8	29,9	5,1	18,8

Infolge der ungewöhnlichen Aktivitätsverteilung in der Raffinose bei *Cerastium arvense* wurden zur Kontrolle bei typischen Raffinosepflanzen (*Catalpa bign.*, 10 min, 20 min; *Fuchsia spec.* 5 min, 30 min; *Taxus baccata* 10 min; *Buddleia davidii* 3 min,

5 min; *Lamium* 30 min, 3 Std.) Photosyntheseversuche in $^{14}\text{CO}_2$ vorgenommen und die intramolekulare Aktivitätsverteilung auftretender Raffinose auf die gleiche Weise wie bei *Cerastium* analysiert. Die in der Tab. 13 zusammengefaßten Ergebnisse brachten eine Bestätigung der Aktivitätsverteilung in der Raffinose, wie sie von Senser und Kandler bei *Lamium* und *Catalpa* ebenfalls gefunden worden war. Ein methodischer Fehler bei der Aufarbeitung der Raffinose konnte damit ausgeschlossen werden.

Am 23.5. hatte die Galactose in der Raffinose nach 30 min Photosynthese schon über 20 % Anteil erreicht. Eigenartigerweise veränderte sich dieser Anteil während längerer Photosynthesezeiten und auch in der Nachbelichtung nur noch unwesentlich.

Die Bestimmung der Pools (s. Tab. 14) ergab nun bei Saccharose, Raffinose und Lychnose sehr starke Schwankungen. Da die spezifische Aktivität dieser Oligosaccharide bis zum 6-Std.-Wert eine konstante Zunahme zeigte, ist anzunehmen, daß bei allen Einzelproben die genannten Oligosaccharide in voneinander stark abweichenden Mengen vorgelegen sein müssen. Der fehlende Fortgang in der Markierung der Galactose der Raffinose bei verschiedenen Versuchen könnte deshalb dem zwar optisch gleichwertigen, physiologisch aber doch sehr heterogenen Pflanzenmaterial zugeschrieben werden.

Am 11.8.1972 hatte die Galactose der Raffinose nach 3 Std. (Raffinose kürzerer Photosynthesezeiten wurde wegen zu geringer Markierung nicht untersucht) 15 % und nach 6 Std. 25 % der Gesamtaktivität des Moleküls erreicht.

Am 7.9.1972 ließ die Galactose der Raffinose in der Kinetik keinen klaren Gang erkennen. Während ihr Anteil nach 30 min Photosynthese mit ca. 15 % noch relativ gering war, lag er bei längeren Photosynthesezeiten stark schwankend aber stets über 20 % und erreichte nach der 18-stündigen Verdrängungsperiode in $^{12}\text{CO}_2$ mit 32 % fast das Niveau von Glucose und Fructose.

Tab. 14: Poolgrößen und spezifische Aktivitäten

Objekt	Datum	PS - Zeit	Saccharose		Raffinose		Lychnose	
			Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$
Gerast. arv.	23.5.1972	30'	0,0089	259.195	0,0015	13.833		
		3 ^h	0,0115	939.891	0,0013	249.519	0,00077	9.903
		6 ^h	0,0033	2.273.864	0,00077	367.045	0,00051	23.578
		6 ^h +	0,0030	430.042	0,0015	365.083	0,00051	297.059
		18 ^{hN}						
Gerast. arv.	15.9.1972	30'	0,0178	462.752	0,010	18.479		
		3 ^h	0,0226	1.169.464	0,0095	349.645	0,0015	107.750
		6 ^h	0,0309	1.076.165	0,0040	468.625	0,00077	203.247
		6 ^h +	0,0302	519.975	0,0081	603.513	0,0042	869.060
		18 ^{hN}						
Gerast. arv.	21.11.1972	5'	0,0134	41.129	0,0059	5.911		
		10'	0,0104	99.279	0,0034	17.941		
		30'	0,0141	469.840	0,0041	95.549		
		3 ^h	0,0398	806.561	0,0079	1.041.044	0,0054	36.436

Tab. 14 ff.

Objekt Datum PS - Zeit	Saccharose				Raffinose				Lychnose			
	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$	Pool $\mu\text{Mol/mg Fgw}$	spez. Akt. $\text{dpm} \cdot 10^3 / \mu\text{Mol}$
Cer. arv. 21.11.72	6 ^h 0,0534	498.261	0,0158	798.790	0,0075	220.600						
	6 ^{h+} 0,0975	506.364	0,0220	688.250	0,0063	958.810						
	18 ^h											
	30'											
	3 ^h											
Stall. Media 23.5.1972	6 ^h 0,0175	1.839.343	0,0027	1.116.204	0,0026	208.654						
	6 ^{h+} 0,0170	574.338	0,0046	1.145.652	0,0032	2.070.313						
	18 ^h											
	30'											
	3 ^h											
Plant. caryoph. 21.11.1972	5 ^h 0,0053	47.524	0,0043	581								
	10'	0,0139	82.239	0,0146	1.070							
	30'	0,0153	135.212	0,0064	8.027							
	3 ^h 0,0167	347.354	0,0110	67.483	0,0084	1.190						
	6 ^h 0,0284	795.599	0,0066	359.688	0,0041	16.159						
	6 ^{h+} 0,0174	348.922	0,0067	336.203	0,0056	64.487						
	18 ^h											

Nur eine Woche später, am 15.9.1972, als schon intensiv Galactoside synthetisiert wurden (siehe Jahresgang), lag schon nach 30 min Photosynthese in der Raffinose Gleichverteilung der Aktivität vor. Angesichts der vorausgegangenen Versuche kam dieses Ergebnis überraschend. Es war dann nicht weniger erstaunlich, daß die einmal erreichte Gleichverteilung nicht etwa beibehalten wurde, sondern mit zunehmender Länge der Photosyntheseperiode die Galactose in ihrem Anteil wieder weit unter den Ausgangswert absank.

Wohl die gleichen Verhältnisse dürften bei dem Photosyntheserversuch am 18.10.1971 vorgelegen haben. Trotz des fehlenden 30 min - Wertes für Photosynthese läßt sich unschwer erkennen, daß die Aktivität des Saccharoseanteils in der Raffinose laufend auf Kosten der Galactose anstieg. Die Galactose fiel von den nach 60 min erreichten 29,7 % bis zum 6-Std.-Wert um ca. 12 % auf 17,9 %. Ihr schwacher Anstieg in der Nachbeleuchtung in $^{12}\text{CO}_2$ dürfte auch hier durch inhomogenes Pflanzenmaterial verursacht werden.

Am 21.11.1972 erreichte die Raffinose die höchsten Markierungsanteile des ganzen Jahres (siehe auch Abb. 11 a-f). Schon nach 5 min Photosynthese enthielt die Raffinose 3,5 % des Gesamtlöslichen und ihr Anteil erhöhte sich bis zum 6-Std.-Wert bis auf 24,2 %. Bei der Analyse der intramolekularen Verteilung konnte nach 5 min Photosynthesezeit in $^{14}\text{CO}_2$ aber noch keine Aktivität in der Galactose festgestellt werden. Nach 10 min Photosynthese betrug dann der Galactoseanteil in der Raffinose 4,5 % und stieg langsam bis zum 6-Std.-Wert auf 16,8 % an, um in der Nachbeleuchtungsperiode wieder schwach abzufallen.

Faßt man die intramolekulare ^{14}C -Verteilung in der Raffinose der beschriebenen Versuche zusammen, so scheinen für die Galactose wenigstens zwei verschiedene Markierungstypen zu existieren:

- a) Bei kurzen Photosynthesezeiten bis etwa zu 60 min wird die Galactose nicht oder nur sehr schwach markiert; dann steigt die Markierung kontinuierlich an, erreicht aber auch in der

Nachbelichtungsperiode niemals das Niveau von Glucose und Fructose: 18.4.72, 12.5.72, 21.11.72.

Dies ist charakteristisch für Photosyntheseversuche am Beginn oder Ende einer Raffinoseabbauperiode.

- b) Nach 30 min Photosynthese liegt in der Raffinose Gleichverteilung der Aktivität vor, die aber nicht über längere Photosynthesezeiten in $^{14}\text{CO}_2$ erhalten bleibt, sondern mit steigender Photosynthesezeit einen signifikanten Abfall zeigt: 15.9.72 und wahrscheinlich auch 18.10.71. Typisch für Photosyntheseversuche, die während einer Periode deutlicher Galactosidsynthese vorgenommen wurden.

Beim Typ a ist offensichtlich während kurzer Zeiten für die Markierung der Raffinose der Austausch des Saccharoseanteils mit dem schnell an Markierung gewinnenden Saccharosepool maßgebend. Demgegenüber scheint die Nettosynthese, für deren Intensität der Markierungsanteil der Galactose angesehen werden könnte, eine wesentlich geringere Rolle zu spielen. Eine bedeutende Nettosynthese ist aber für die oben genannten Zeiten auch auf Grund der Poolbestimmung nicht anzunehmen.

Der Typ b manifestiert durch den schon bei kurzen Zeiten hohen Galactoseanteil eine deutliche Nettosynthese der Raffinose. Auf das Phänomen des "Auskühlens" der Galactose soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

3.4.1.1.3.2. Lychnose

Die Analyse der intramolekularen ^{14}C -Verteilung in der Lychnose bei verschiedenen Photosynthesezeiten sollte nun Hinweise auf das Acceptormolekül bei der Lychnosesynthese liefern. Diese Analyse konnte aber nur in beschränktem Umfang durchgeführt werden, da bei den ohnehin schon viel geringeren Aktivitäten durch den mehrstufigen Arbeitsgang (siehe Material und Methoden) ein weiterer Substanz- und Aktivitätsverlust unvermeidbar war.

Bei *Lamium* entsteht die Stachyose durch Übertragung einer aktivierten Galactose (Galactinol) auf Raffinose (Senser und Kandler, 1967). Bei Photosynthesezeiten von 2 bis 10 min (Lychnose wird nur in seltenen Fällen bei kürzeren Photosynthesezeiten als 60 min markiert!) war diese Galactose deutlich stärker markiert als die innere, aus der Raffinose stammende Galactose. In der Raffinosegalactose war aber immer noch mehr Aktivität zu finden als in Glucose und Fructose des Saccharoseanteiles.

Die Synthese der Lychnose wäre analog dazu durch eine Übertragung einer Galactose auf Raffinose oder Iso-Planteose denkbar. Die wegen der geringen Markierung der Isoplanteose nur in wenigen Fällen vorgenommene Analyse der intramolekularen ^{14}C -Verteilung ergab im Saccharoseanteil ein starkes Überwiegen der Markierung der Glucose, das wahrscheinlich von einer Überlagerung der Iso-Planteose durch Maltotriose herührt. Zwar wäre eine Trennung der beiden Trisaccharide nach enzymatischer Spaltung der Iso-Planteose mit α -Galactosidase (zu Saccharose und Galactose) im Prinzip leicht möglich, wurde aber wegen zu geringer Ausgangsaktivitäten nicht mehr durchgeführt. Ohne auf die intramolekulare Aktivitätsverteilung noch näher einzugehen, scheint die Iso-Planteose schon wegen ihres Markierungsverhaltens (erscheint zeitlich erst weit nach der Lychnose) als Galactoseacceptor auszuschneiden.

Nimmt man nun an, daß die Lychnose, wie auf Grund der Markierungskinetik wahrscheinlich, ähnlich wie die Stachyose durch Übertragung einer Galactose auf Raffinose entsteht, dann wäre für die an die Fructose gebundene Galactose ein deutlich höherer Aktivitätsanteil zu erwarten als für die aus der Raffinose stammende Galactose. Bemerkenswerterweise konnte aber die erwartete Aktivitätsverteilung nicht in einem einzigen Fall gefunden werden (siehe Tab. 11). Die an die Fructose gebundene Galactose war durchweg schlechter markiert als die glucosylgebundene Galactose und die Monosaccharide des Saccharoseanteils. Greift man den Markierungsanteil der glucosylgebundenen Galactose heraus, so scheinen bei der Lychnose parallel zur Raffinose zwei

verschiedene Markierungstypen vorzuliegen.

- a) Zu Zeiten geringer Galactosidsynthese ist die glucosylgebundene Galactose deutlich schlechter markiert als die Glucose und Fructose des Saccharoseanteils. Ihr Anteil an der Markierung geht mit zunehmender Dauer der Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ zurück; gleichzeitig steigt der der fructosylgebundenen Galactose an. Beispiele: 23.5.72, 29.5.72, evtl. 18.4.72.
- b) Während intensiver Galactosidsynthese dominiert die glucosylgebundene Galactose stark über die Glucose; bei einer Photosynthesezeit von 60 min erreicht sie bis zum dreifachen des Glucosewertes. Ihr Anteil sinkt mit steigender Photosynthesezeit in $^{14}\text{CO}_2$ stark ab, während der Nachbeleuchtung in $^{12}\text{CO}_2$ teilweise sogar unter den Glucosewert. Beispiele 7.9.72, 15.9.72, 18.10.71.

Vergleicht man in der Raffinose und im Raffinoseteil der Lychnose gleicher Photosynthesezeiten den ^{14}C -Anteil der Galactose mit dem der Glucose (Gal/Glu Verhältnis), so ist aber, wie Tab. 15 zeigt, keinerlei Übereinstimmung festzustellen.

Tab. 15: Verhältnis des ^{14}C -Anteils der glucosylgebundenen Galactose zu der Glucose in der Raffinose und im Raffinoseteil der Lychnose bei verschiedenen Photosyntheseversuchen mit *Cerastium arvense*

Datum	PS-Zeit	^{14}C -Gal / ^{14}C -Glu in Raffinose i. Raff.-teil d. Lych.	
7.9.72	30'	0,73	3,0
15.9.72	60'	0,71	2,0
18.10.71	3 h	0,76	2,7

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß bei *Cerastium arvense* auf Grund der Photosyntheseversuche konkrete Aussagen über Galactosyldonor und Galactoseacceptor bei der Lychnosesynthese kaum möglich erscheinen.

3.4.1.2. Stellaria media

Bei den Photosyntheseversuchen mit *Stellaria media* wurde am 7.3.72 Gewächshaus- und am 23.5.72 Freilandmaterial verwendet. Die am 7.3.72 verwendete Versuchspflanze war im Gewächshaus angezogen worden. Da bei regelmäßigen Kontrollen keinerlei Galactoside festgestellt werden konnten, erhielt die Pflanze eine Zusatzbeleuchtung (Osram Superlux 300 W, ein Meter Abstand in der Zeit von 6 Uhr 30 bis 18 Uhr 30). Als nach drei Wochen Galactosidproduktion einsetzte, wurde der Versuch vorgenommen.

Wie Tab. 16 zeigt, wurden die Galactoside, insbesondere die Raffinose, in erstaunlichem Maße markiert. Nach 30 min Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ lagen schon fast 13 % der Aktivität des Gesamtlöslichen in der Raffinose. Bis zu einer Photosynthesezeit von 6 Std. in $^{14}\text{CO}_2$ steigt ihr Anteil mit 24,9 % fast auf den doppelten Wert, der dann in der Nachbelichtungszeit geringfügig absank. Eigenartigerweise zeigte die Aktivitätsverteilung in der Raffinose in der Kinetik keine signifikante Veränderung. Der Galactoseanteil von ca. 14 % nach 30 min Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ blieb auch hier weit hinter dem Wert von Glucose und Fructose zurück. Längere Photosynthesezeiten in $^{14}\text{CO}_2$ und auch eine Nachbelichtung von 18 Std. in $^{12}\text{CO}_2$ brachten nur eine schwache Erhöhung des Galactoseanteiles.

In der Lychnose dominierte die glucosylgebundene Galactose über die an der Fructose gebundene Galactose. Der Anteil beider Galactosen war gegenüber den Monosacchariden des Saccharoseanteiles stark diskriminiert. Bei einer Verlängerung der Photosynthesezeit war zwar ein deutlicher Anstieg zu erkennen, ohne daß aber der Prozentsatz der Glucose erreicht worden wäre.

Tab. 16: Prozentualer Anteil verschiedener Oligosaccharide und Galactinol am ^{14}C -Gehalt der löslichen Fraktion und intramolekulare ^{14}C -Verteilung in Raffinose und Lychnose in %

Objekt	Datum	PS - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Lösli. Fraktion) cpm · 10 ³ / mg Fgw	Saccharose			Raffinose			Lychnose			Iso- Galac- Lychnose tinol	
				%-Anteil	%-Anteil	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal	%-Anteil
Stellaria media	7.3.1972	30'	643	70,6	12,7	14,2	42,1	43,7						1,9
		60'	1219	69,0	15,5	8,8	44,9	46,3	0,1					1,3
		3 ^h	3462	59,1	23,6	11,0	42,8	46,2	0,5	16	36	42	6	0,3
		6 ^h	7310	54,1	24,9	14,0	42,6	43,4	1,0	23	34	35	8	0,4
		6 ^h +	1404	22,6	23,4	17,8	39,6	42,6	4,7	24	34	33	9	1,6
		18 ^h												0,7
Stellaria media	23.5.1972	30'	644	74,9	1,6	12,7	41,2	46,1						0,2
		60'	1196	73,5	1,6	14,2	43,8	42,0						0,2
		3 ^h	5305	73,2	0,3	16,8	43,6	39,6						0,1
		6 ^h	8442	60,3	2,1	22,8	39,2	38,0	0,1					0,1
		6 ^h +	4488	32,2	14,9	29,3	35,7	35,0	2,0	21,2	26,8	31,2	20,8	0,3
		18 ^h												

Am 23.5.72 wurden die Saccharosegalactoside erheblich schwächer markiert als am 7.3.72. Der Anteil der Galactose der Raffinose ließ bei etwa gleichem Ausgangswert wie am 7.3.72 einen gleichmäßigen Anstieg erkennen und erreichte nach 18 Std. Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ fast das Niveau der Glucose.

Die Lychnose des Nachbelichtungswertes in $^{12}\text{CO}_2$ zeigte eine auffallend hohe Markierung der fructosylgebundenen Galactose. Da es sich hier aber um einen Einzelwert handelt, sind weitergehende Aussagen nicht möglich.

3.4.1.3. Verschiedene Silenoideen

Die im Anhang aufgeführten Photosyntheseversuche mit *Dianthus caryophyllus*, *Silene dioica* und *Viscaria vulgaris* erbrachten im wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie bei *Cerastium arvense*, mit nur dem einen Unterschied, daß die Galactosidproduktion in den Blättern wesentlich geringer war als bei den besprochenen Alsinoideen. Eine Detailbesprechung erübrigt sich deshalb.

3.4.1.4. *Herniaria glabra*

Der am 21.6.72 mit *Herniaria glabra* vorgenommene Photosyntheseversuch lag in einer Periode, wo außer in *Herniaria glabra* bei keiner untersuchten Caryophyllacee Lychnosezucker in den Blättern gefunden werden konnten. Da auch bei Photosyntheseversuchen mit *Cerastium arvense*, *Dianthus caryophyllus*, *Dianthus carthusianorum*, *Silene dioica* und *Viscaria vulgaris* im Juni 1971 bis 60 min Photosynthese keinerlei markierte Saccharosegalactoside auftraten, überraschte der hohe Prozentsatz an markierter Raffinose nach 30 min Photosynthese bei *Herniaria glabra* (Tab. 17). Von 9 % nach 30 min Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ stieg er auf fast 23 % nach 6 Std. Photosynthese, ging aber in der Nachbelichtungszeit bis auf 5 % zurück. Ein ähnlich starker Rückgang war bei keinem anderen Photosyntheseversuch

Tab. 17: Prozentualer Anteil verschiedener Oligosaccharide und Galactinol am ^{14}C -Gehalt der löslichen Fraktion und intramolekulare ^{14}C -Verteilung in Raffinose, Lichnose und Stachyose

Objekt	Datum	PS - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Tösl.-Fraktion) $\text{cpm} \cdot 10^3 / \text{mg Fgw}$	Saccharose			Raffinose			Lichnose			Iso- Lichnose Anteil	Galac- tinol Anteil
				%-Anteil	%-Anteil	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal	
Herniaria Labra	21. Juni 1972	30'	792	69,5	9,0	30,7	35,8	33,5	0,04					0,7
		60'	1976	75,1	9,6	23,3	38,8	37,9	0,04					0,5
		3 ^h	4296	64,8	11,8	21,2	38,4	40,4	0,09	50,4	24,1	22,3	10,2	0,5
		6 ^h	5419	43,3	22,8	26,9	35,6	37,5	0,58	55,3	16,8	19,7	8,2	0,9
		6 ^h +	538	17,9	5,0	28,2	35,2	36,6	0,88	41,3	24,1	25,3	11,3	0,1
		18 ^h												
		6 ^h +	3064	20,3	12,9	21,0	39,6	39,4	1,79	42,7	18,5	24,5	14,3	0,3
		18 ^h ND												
										Stachyose				
								Zeit	%	Gal ₁	Gal ₂	Glu	Fru	
								30'	0,04					
								60'	0,05					
								3 ^h	0,15					
								6 ^h	1,60	10,1	24,6	33,4	31,9	
								6 ^h +	1,18					
								18 ^h N						
								6 ^h +	2,87	8,4	23,1	34,2	34,3	
								18 ^h ND						

beobachtet worden. Ein starker Umsatz des Raffinosepools ist deshalb anzunehmen. Dafür spricht der hohe Aktivitätsanteil der Melibiose (2,3 %) und die gleichzeitige und etwa gleichstarke Markierung der beiden Tetrasaccharide Stachyose und Lychnose am Ende der Verdrängungsperiode. (siehe folgende Abb.).

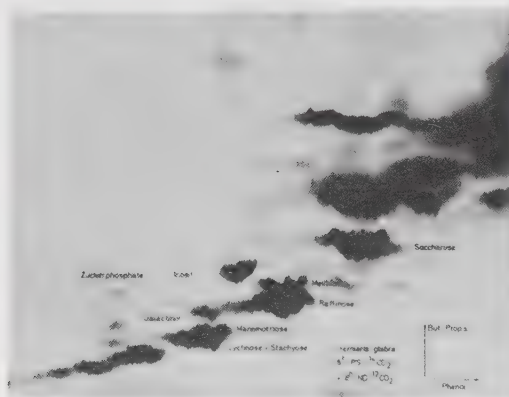


Abb. 12

Autoradiogramm eines Blattextraktes von *Herniaria glabra* nach 6 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ und 18 Std. Nachverdunkelung in $^{12}\text{CO}_2$

Die intramolekulare Aktivitätsverteilung in der Raffinose ergab nach 30 min Photosynthese nahezu Gleichverteilung der Aktivität. Der Galactoseanteil fiel dann bis zum 3-Std.-Wert ab, zeigte unerklärlicherweise dann aber beim 6-Std.- und beim Nachbelichtungswert einen deutlich erhöhten Prozentsatz.

Die ^{14}C -Verteilung in der Lychnose erinnert an die bei *Cerastium* während der Galactosidsynthesezeit gefundenen Verhältnisse. Bei relativ geringer Markierung der an die Fructose gebundenen Galactose erreichte die glucosylgebundene Galactose nach 3 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ mehr als die doppelte Höhe der Glucose.

Beim 6-Std.-Wert hatte sich das Gal / Glu Verhältnis der Lychnose dann auf 3,3 : 1 erhöht. Da hier auch die Raffinose einen aus dem Rahmen fallenden Galactoseanteil besaß, ist anzunehmen, daß bei 6-Std.-Wert (und auch beim Nachbelichtungswert) ein Pflanzenteil mit erhöhter Galactosidsynthese vorlag. Für alle untersuchten Werte gilt wie bei *Cerastium*, daß das Gal / Glu Verhältnis der Raffinose von dem des Raffinoseteils der Lychnose gleicher Photosynthesezeit sehr stark abweicht.

Die nur bei zwei Photosynthesezeiten (6 Std. und 6 Std. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ + 18 Std. Nachverdunkelung) ermittelte Aktivitätsverteilung in der Stachyose zeigt nicht etwa Gleichverteilung, wie sie entsprechend den Ergebnissen typischer Raffinosepflanzen erwartet worden wäre. Beide Galactosen bleiben in ihrer Markierung deutlich hinter der Glucose zurück. Überraschenderweise erreicht die zuletzt angeknüpfte äußere Galactose nicht einmal die Hälfte der "inneren" Galactose (aus der Raffinose). Im Gegensatz zu der Lychnose liegt hier eine gute Übereinstimmung zwischen den Markierungsverhältnissen des Raffinoseanteils der Stachyose und der Raffinose vor. Es erscheint deshalb naheliegend, einen Austausch zwischen dem Raffinosepool und dem Raffinoseanteil der Stachyose bei *Herniaria glabra* anzunehmen.

3.4.2. Fütterung von ^{14}C -markierten Substanzen

Jeremias und Kull (1971) hatten nach Applikation markierter Galactose an Blätter von *Lamium* mit Galactose-1-P und Galactinol Zwischenprodukte der Biosynthese der Raffinosezucker erhalten. Es erschien deshalb grundsätzlich möglich, auch im speziellen Fall der Lychnosebiosynthese durch Verfütterung geeigneter Verbindungen eine Anhäufung von markierten Vorläufern zu erhalten. Die bei *Stellaria media*, *Cerastium arvense* und *Lamium album* mit ^{14}C -markierten Kohlenhydraten vorgenommenen Fütterungsversuche sollten außerdem auch zur Kontrolle der bei den Photosyntheseversuchen erhaltenen Ergebnisse (insbesondere der intramolekularen ^{14}C -Verteilung in

den Oligosacchariden) dienen.

3.4.2.1. Chromatographische Analyse

Die chromatographische Analyse der im Frühjahr am 13. und 20.3.72 mit *Stellaria media* (gleiches Pflanzenmaterial wie bei dem Photosyntheseversuch vom 7.3.72) vorgenommenen Fütterungsversuche ergab, daß, unabhängig von der verfütterten Substanz (Galactose, UDP-Galactose, Galactinol, Saccharose, Raffinose), neben Saccharose und ihren Galactosiden markierte Zuckerphosphate und Zuckernucleotide auftraten. Die Fütterungsversuche im Herbst mit *Cerastium arvense* am 26.9.1972, *Stellaria media* und *Lamium album* am 10.10.1972 (verfütterte Substanzen: Galactose, Glucose, Fructose, Saccharose, Galactinol, UDP-Galactose) ergaben dann bei qualitativ unverändertem Bild eine wesentlich stärkere Markierung der Saccharosegalactoside als im Frühjahr; bei *Lamium album* handelte es sich dabei ausschließlich um Raffinosezucker.

Stellaria media setzte bei allen Versuchen verfüttertes UDP-Gal-¹⁴C zum größten Teil in eine nicht näher identifizierte Verbindung um, bei der es sich, dem Verhalten bei der zweidimensionalen Chromatographie und der Elektrophorese nach zu schließen, um ein zyklisches Phosphat handeln könnte. Bemerkenswerterweise nahm der Anteil dieser Verbindung bei 24-stündiger Fütterungsdauer wieder ab: Saccharose und Raffinose erhöhten gleichzeitig ihren Anteil an ¹⁴C in entsprechendem Maße.

3.4.2.2. Intramolekulare ¹⁴C-Verteilung

Die Ergebnisse der intramolekularen Aktivitätsverteilung sind in Tabelle 18 zusammengefaßt:

- a) Saccharose: Bei *Lamium album* lag unabhängig von der verfütterten Substanz bei allen Proben in der Saccharose weitgehend Gleichverteilung der Aktivität vor; offenbar ver-

Tab. 18 : Intramolekulare Aktivitätsverteilung in Saccharose
und Raffinose

Objekt Datum	verfügt. Zucker	Saccharose		Raffinose		
		Glu	Fru	Gal	Glu	Fru
Laminum album 10.10.1972	Gal	52,6	47,4	37,6	31,7	30,7
	Glu	50,0	50,0	34,7	34,2	31,1
	Fru	47,5	52,5	17,7	37,8	44,5
	Sacch	-	-	36,2	34,4	29,4
	Galol	53,9	46,1	45,0	30,8	24,2
UDP-Gal		51,4	48,6	36,5	31,0	32,4

Tab. 18: Intramolekulare Aktivitätsverteilung in Saccharose, Raffinose und Lychnose
Fütterungsdauer Probe a: 6 Std., Probe b: 24 Std.

Objekt Datum Verteilt. Zucker	Saccharose			Raffinose			Lychnose		
	Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal
Gerastium arvense 26.9.1972	Gal a	64,7	35,3	67,4	20,5	12,1	64,5	7,0	6,6
	Gal b	55,9	44,1	65,5	19,0	15,5	50,6	15,0	13,5
	Gal a	57,5	42,5	72,0	16,6	11,4	67,9	4,1	3,6
	Gal b	57,9	42,1	55,1	26,8	18,1	63,6	13,9	11,2
	Glu a	54,2	45,8	36,1	35,9	28,0	58,9	15,8	11,0
	Glu b	53,0	47,0	46,2	28,6	25,2	49,7	14,7	13,2
	Fru a	47,1	52,9	44,4	26,3	29,3	58,8	13,2	8,4
	Fru b	50,2	49,8	43,9	31,3	24,8	44,3	15,5	16,8

Tab. 18 ff:

Objekt Datum	Verfüt- tungs- Zucker	Saccharose		Raffinose			Lychnose		
		Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal ₁	Glu	Fru Gal ₂
Gerastium arvensis 26.9.1972	Sacch a	-	-	14,1	43,1	42,8	22,0	36,7	33,3 10,0
	Sacch b	-	-	22,4	36,8	40,8	13,8	36,2	37,0 13,0
	Galol a	57,9	42,1	64,4	21,4	14,2	66,8	5,2	4,6 23,4
	Galol b	55,5	44,5	53,7	28,1	18,2	54,6	12,1	13,3 20,1
	UDP-Gal a	56,7	43,3	68,7	17,9	13,4	57,1	9,0	6,7 21,2
	UDP-Gal b	56,9	43,1	47,6	28,9	21,5			

Objekt Datum	verfüttert. Zucker	Saccharose		Raffinose		
		Glu	Fru	Gal	Glu	Fru
Stellaria media 20.3.1972	U*Gal + Meli a	64,7	35,3	28	49	23
	U*Gal + Meli b	58,0	42,0	29	37	34
	U*Gal + Glu a	62,1	37,9	24	51	25
	U*Gal + Glu b	60,7	39,3	29	43	28
Stellaria media 13.3.1972	Sacch a	-	-	0	53	47
	Sacch b	-	-	13,7	47,8	38,5
	Raff a			-	-	-
	Raff b			-	-	-
	U*Gal + Raff a	66	34	0	69,2	30,8
	U*Gal + Raff b	57,8	42,2	11	51,	38
	U*Gal + Meli a	65,6	34,4	0	69,5	30,5
	U*Gal + Meli b	63	37	22,1	47,1	29,8
	U*Gal + Glu a	64	36	0	63,9	36,1
	U*Gal + Glu b	61,3	38,7	22,8	48,9	28,3
	*Galola + Raff ^a	63,5	36,5	16,4	54	29,6
	*Galola + Raff ^b	65,6	34,4	16,2	55,4	28,4

Tab. 18 : Intramolekulare Aktivitätsverteilung in Saccharose und Raffinose. Fütterungsdauer: Probe a: 6 Std., Probe b 24 Std.

Objekt Datum	verfitt. Zucker	Saccharose		Raffinose		
		Glu	Fru	Gal	Glu	Fru
Stellaria media 10.10.1972	Gal a	61,1	39,9	43,3	33,9	22,8
	Gal b					
	Glu a	53,9	46,1	49,5	27,6	22,9
	Glu b	53,0	47,0	58,9	21,3	19,8
	Fru a	48,0	52,0	39,9	28,7	31,4
	Fru b	48,6	51,4			
	Sacch a	-	-	17,1	41,6	41,2
	Sacch b	-	-			
	Galol a	56,0	44,0			
	Galol b	56,8	43,2	74,4	15,4	10,2
	UDP-Gal a	54,0	46,0	33,1	39,3	27,5
	UDP-Gal b	57,8	42,2			
Stell. media 20.3.1972	U*Gal b	54,6	45,4	35	36	29
	U*Gal + Raff a	60,9	39,1	28	45	27
	U*Gal + Raff b	56,3	43,7	32	42	26

läuft hier die Umwandlung der Monosaccharide ineinander besonders rasch. Die einzelnen Umwandlungsschritte, die bei der Verfütterung der Monosaccharide Galactose, Glucose oder Fructose zur Synthese der Saccharose erforderlich sind, sind in Abb. 13 zusammengefaßt.

Anders verhielt es sich bei *Stellaria* und *Cerastium*. Gleich, ob freie oder aktivierte Galactose verfüttert wurden, war stets ein starkes Übergewicht der Glucose über die Fructose festzustellen, das sich bei der längeren Fütterungszeit meistens verringerte.

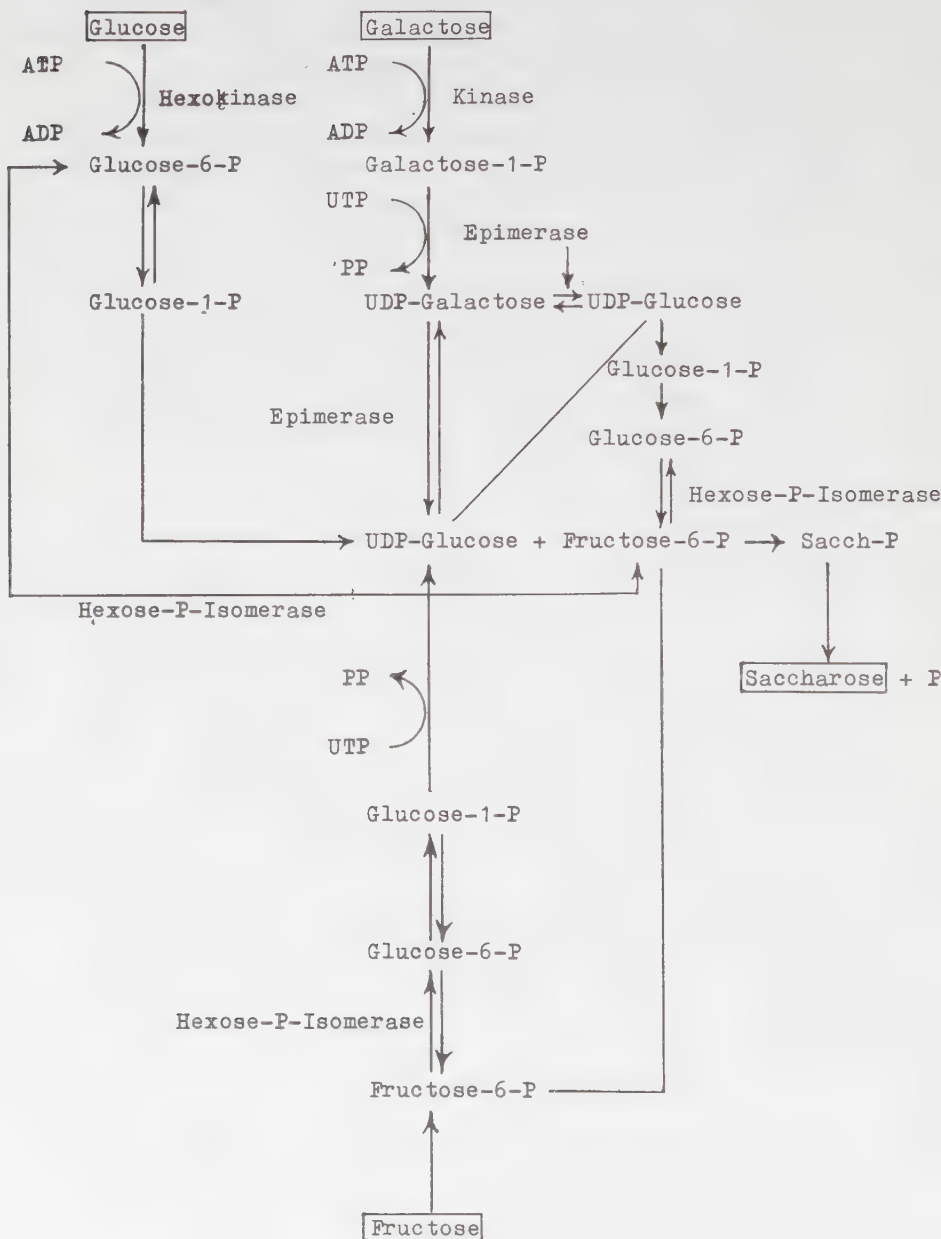
Glucosefütterung führte zu einem schwachen Übergewicht des Glucoseanteiles. Nach Fructoseverfütterung lag bei allen Pflanzen nur ein schwach überwiegender Fructoseanteil vor. Es ist deshalb anzunehmen, daß auch hier die Saccharosesynthese hauptsächlich über das Fructose-6-P und nicht über die freie Fructose erfolgt.

Da auch nach 24 Std. immer noch große Mengen an nicht assimilierten Zuckern vorhanden waren, aus denen laufend Saccharose synthetisiert wurde, war es nicht verwunderlich, daß auch nach dieser Zeit in der Saccharose immer noch keine Gleichverteilung der Aktivität vorlag.

- b) Raffinose: Nimmt man den Galactoseanteil in der Raffinose als Maß für die Raffinosesynthese, so zeigte sich, daß am 13.3. nur eine sehr schwache Nettosynthese vorhanden war. Nach 6 Std. war nämlich in keinem Versuch in der Galactose Aktivität nachweisbar; nach 24 Std. hatte die Galactose zwar merklich Aktivität genommen, aber noch immer nicht das Niveau der Fructose erreicht, die in charakteristischer Weise analog zur Verteilung in der Saccharose deutlich schwächer markiert war als die Glucose. Es wurden also alle angebotenen Zucker bevorzugt in den Saccharoseaufbau eingeschleust.

Eine Woche später, am 20.3.1972 war die Fähigkeit zur Raffinoseneusynthese schon relativ stark ausgeprägt, denn

Abb. 13: Einbau von Galactose, Glucose und Fructose in Saccharose



schon nach 6 Std. hatte die Galactose wenigstens das Niveau der Fructose erreicht und vergrößerte ihren Anteil bei längerer Fütterungszeit noch deutlich.

Während der Hauptperiode der Galactosidsynthese im September kam es bei *Stellaria* und auch bei *Cerastium* zu einer deutlichen Veränderung der ^{14}C -Verteilung in der Raffinose. Bei Fütterung freier U- ^{14}C -Monosaccharide, Galactinol und UDP-Gal- ^{14}C wurde stets die Galactose im Raffinosemolekül am stärksten markiert. Bei *Stellaria media*, die, wie bereits beschrieben, exogen appliziertes UDP-Gal zum größten Teil in das vermutete zyklische Phosphat umsetzte, war nicht die Galactose, sondern Glucose am stärksten markiert, gefolgt von Galactose und Fructose.

Bei Saccharosefütterung wurde dagegen der Galactoseanteil der Raffinose nur relativ schwach markiert, obwohl zu dieser Zeit eine deutliche Galactosidproduktion stattfand. Es muß deshalb angenommen werden, daß Saccharose zum großen Teil ungespalten in den Kohlenhydrataufbau einbezogen wurde.

Bei *Lamium album* lag mit Ausnahme der Fructose- und der Galactinol-fütterung bei allen Versuchen in der Raffinose annähernd Gleichverteilung vor. Im Vergleich zu dem Versuch mit *Stellaria media* am gleichen Tag, wo bei keiner Probe uniform markierte Raffinose auftrat, schien sich also *Lamium album* am 10.10.72 durch den besonders intensiven Umsatz in den Oligosacchariden auszuzeichnen. Bei Galactinol-fütterung wies die Galactose in der Raffinose einen gegenüber den anderen Versuchen deutlich erhöhten Markierungsanteil auf, wie es der bekannten Rolle des Galactinols als Cofaktor bei der Raffinosebiosynthese von *Lamium* entspricht. Bei der Fructosefütterung trat in der Raffinose eine stark abweichende Aktivitätsverteilung auf. Während die Fructose mit fast 45 % nahezu die Hälfte der Aktivität in der Raffinose auf sich vereinigte, fanden sich im Galactoseanteil nur knapp 18 %. Diese schwache Markierung der Galactose könnte dadurch erklärt werden, daß

1. die freie Fructose zum Teil direkt in die Saccharose-synthese eingeschleust wird und
2. bei der Umwandlung der Fructose in die Galactose gegenüber der Glucose wenigstens ein weiterer Pool durchlaufen werden muß, der zu einer zusätzlichen Verdünnung der Aktivität in der Galactose führt.

c) Lychnose: Die Markierung der Lychnose war bei allen Versuchen mit *Stellaria media* für eine Analyse der intramolekularen ^{14}C -Verteilung zu gering. Bei *Cerastium* zeigte im Herbst die intramolekulare Aktivitätsverteilung in der Lychnose, daß, ähnlich wie bei Raffinose, die verfütterten freien oder aktivierten Monosaccharide bevorzugt zur Synthese des Galactoseteiles herangezogen werden. Dies ist besonders deutlich bei der Applikation freier und aktivierter Galactose, wo der Saccharoseanteil nach 6 Std. nur etwa 10 % der Aktivität des Gesamtmoleküls auf sich vereinigt. Bei 24-stündiger Fütterungszeit erhöht er dann seinen Anteil auf 20 bis 30 %.

Die glucosylgebundene Galactose dominierte über die fructosylgebundene Galactose, die ihrerseits noch deutlich stärker markiert war als Glucose oder Fructose des Saccharoseanteiles und bei 24 Std. Fütterungsdauer in der Regel ihrem Prozentanteil gegenüber dem 6-Std.-Wert erhöht.

Bei Applikation von Saccharose blieben die beiden Galactosen aus den schon bei der Analyse der Raffinose genannten Gründen merklich hinter dem Saccharoseanteil zurück.

Das Verhältnis der glucosylgebundenen Galactose zur Glucose war wie bei den jahreszeitlich entsprechenden Photosyntheserversuchen in der Lychnose wesentlich höher als in der Raffinose, wie es Tabelle 19 zeigt.

Tab. 19: Verhältnis des ^{14}C -Anteiles der glucosylgebundenen Galactose zu dem der Glucose in der Raffinose und dem Raffinoseteil der Lychnose bei Fütterung verschiedener markierter Zucker an *Cerastium arvense*

verfütterte Zucker	^{14}C -Gal in Raffinose	^{14}C -Glu i. Raff. teil d. Lych.
Galactose a	4,3	16,6
Galactose b	2,1	4,6
Glucose a	1,0	3,7
Glucose b	1,6	3,4
Fructose a	1,7	4,5
Fructose b	1,4	2,9
Galactinola	3,0	12,9
Galactinolb	1,9	4,5

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse der Fütterungsversuche eine Bestätigung der bereits aus den Photosyntheseversuchen erhaltenen Befunde dar, ohne daß deshalb konkrete Aussagen über den Galactosedonor möglich erschienen, denn eine auffallende Anhäufung eines möglichen Vorläufers konnte nicht beobachtet werden.

3.4.3. Enzymversuche zur Biosynthese der Raffinose und der Lychnose bei Caryophyllaceen

Um eine definitive Aussage über die Natur des Donors und des Acceptors bei der Biosynthese von Raffinose und Lychnose zu erhalten, erschien es nötig, die bei der Synthese der beiden Oligosaccharide wirksamen Galactosyltransferasen zu isolieren.

3.4.3.1. Enzympräparation aus Blättern von *Cerastium arvense*

Die Enzymversuche wurden mit Blättern von *Cerastium arvense* zu einer Zeit durchgeführt, in der auf Grund einer laufenden chromatographischen Untersuchung des Zuckerspektrums eine Synthese von Raffinose und Lychnosezuckern angenommen werden mußte.

Alle Schritte der Enzympräparation wurden bei 0-4°C vorgenommen.

15 g Blätter wurden nach kurzem Eintauchen in flüssigen Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser zermahlen und zu dem Pulver unlösliches Polyvinylpyrrolidon zur Entfernung pflanzlicher Phenolderivate (Loomis und Bataille, 1966) im Verhältnis 1:1 (g:g) zugegeben. Das Gemisch wurde dann mit 100 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 extrahiert, der als SH-Schutz Dithioerythrit (DTE, Clelands Reagens) in einer Konzentration von 0,01 M enthielt. Nach dem Auftauen wurde das Homogenat durch Verbandmull gepreßt und das Filtrat dann in einer Kühlzentrifuge bei 15000 x g 10 min zentrifugiert.

Der Rohextrakt wurde unter ständigem Rühren mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 35 % versetzt und nach 10 min bei 15000 x g abzentrifugiert. Dem Überstand wurde dann weiter Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 80 % zugegeben und nach 10 min Rühren das ausgefallene Protein bei 15000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1-2 ml Extraktionspuffer aufgenommen.

Die gesamte Proteinlösung wurde auf eine Sephadex-G-25-Säule (15 x 2 cm) aufgetragen und das Protein mit Extraktionspuffer eluiert. Die das Gesamtprotein enthaltende Spitzenfraktion wurde dann auf Enzymaktivität getestet.

3.4.3.2. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Versuche wurden in kleinen Fiolaxgläsern durchgeführt.

Der Ansatz enthielt je nach Versuchsanstellung in einem Endvolumen von 130 μ l: 0,15 μ Ci 14 C-Raffinose (21 μ Ci/ μ Mol) bzw. 2,5 μ Ci 14 C-Saccharose (60 μ Ci/ μ Mol). Die Menge der eingesetzten, unmarkierten Substrate betrug jeweils 1 μ Mol. In jedem Test wurden 100 μ l Proteinlösung (28,7 mg Protein/ml) eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug bei 32°C 2 Stunden.

Folgende Enzymaktivitäten wurden in getrennten Ansätzen getestet:

a) Synthesereaktionen:

- a₁) 14 C-Saccharose + Galactinol $\rightleftharpoons$ 14 C-Raffinose + myo-Inosit
a₂) 14 C-Raffinose + Galactinol $\rightleftharpoons$ 14 C-Lychnose + myo-Inosit
a₃) 14 C-Raffinose + Galactose-1-P $\rightleftharpoons$ 14 C-Lychnose + Phosphat
a₄) 14 C-Raffinose + UDP-Galactose $\rightleftharpoons$ 14 C-Lychnose + UDP

b) Austauschreaktionen:

- b₁) 14 C-Saccharose + Raffinose $\rightleftharpoons$ 14 C-Raffinose + Saccharose
b₂) 14 C-Raffinose + Lychnose $\rightleftharpoons$ 14 C-Lychnose + Raffinose

c) α -Galactosidaseaktivität:

Nach der Inkubation von U- 14 C-Raffinose mit Enzym wurde die abgespaltene 14 C-Galactose gemessen.

d) Invertaseaktivität:

U- 14 C-Saccharose wurde mit Enzym inkubiert und anschließend die freigesetzte 14 C-Fructose gemessen.

e) UDP-Galactose-4-Epimerase-Aktivität:

UDP-Galactose- 14 C wurde mit Enzym inkubiert und anschließend nach Abtrennung des Proteins 10 min mit 1n HCl bei 100°C hydrolysiert. Die Epimeraseaktivität wurde durch Messung des Verhältnisses von 14 C-Galactose zu 14 C-Glucose erfaßt.

3.4.3.3. Ergebnisse

Die Synthese einer neuen radioaktiven Verbindung konnte nur in den Testen a₁ und b₁ festgestellt werden. Die Verbindung verhielt sich in der Papierchromatographie in den Lösungsmitteln 2, 3 und 4 wie Raffinose. Im Kontrollversuch zu a₁

konnte in Abwesenheit von Galactinol keine Raffinosebildung festgestellt werden.

Die in den Testen a₁ und b₁ erhaltene radioaktive Verbindung war invertaselabil. Die enzymatische Spaltung mit α -Galactosidase ergab als einzige radioaktive Verbindung ¹⁴C-Saccharose. Auf Grund des Verhaltens in der Papierchromatographie und im enzymatischen Test dürfte es sich bei der festgestellten radioaktiven Verbindung mit ziemlicher Sicherheit um Raffinose handeln.

4. Diskussion

4.1. Verteilung von Galactosiden in den Pflanzen

Raffinose und die Saccharosegalactoside vom Lychnose- bzw. Isolychnosetyp sind bei den Caryophyllaceen weit verbreitet und finden sich in etwa entsprechender Menge in den Blättern, Sprossen und Wurzeln. Courtois hatte im Gegensatz zu unseren Beobachtungen in den Blättern von *Silene dioica*, *Silene cucubalus* und *Dianthus caryophyllus* niemals Lychnose- oder Isolychnosezucker feststellen können. Die Ursache für den unterschiedlichen Befund könnte in der jahreszeitlichen Abhängigkeit der Galactosidspeicherung liegen, die in den Blättern und in den Speicherorganen nicht immer völlig synchron erfolgt.

Während aus dem Oligosaccharidspektrum der Samen häufig ein guter Überblick über die in der ganzen Pflanze vorkommenden Oligosaccharide erhalten werden kann, scheint bei den Caryophyllaceen, wie bereits von Courtois bei einigen Arten festgestellt wurde, allgemein kein Zusammenhang zwischen dem Spektrum der Galactoside in den Speicherorganen (neben Raffinose meist Lychnose- und Isolychnosezucker) und dem der Samen (ausschließlich Raffinosezucker) zu bestehen. Dies betraf auch die Zahl der verschiedenen Oligomeren: Während von den vegetativen Pflanzenteilen Oligomere bis zum Oktasaccharid gefunden wurden, waren in den Samen niemals höhere Oligomere als das Tetrasaccharid Stachyose nachweisbar. Das von Courtois bei Samen von *Silene cucubalus* festgestellte Auftreten von Lychnose und Isolychnose konnte von uns nicht bestätigt werden.

Im Blütenbereich erfolgt die zur Bildung der Raffinosezucker führende physiologische Umstimmung im Juli/August zu einer Zeit, in der in den vegetativen Teilen der Pflanze keinerlei Anhäufung von Lychnosezuckern erfolgt.

Lychnose und Isolychnose scheinen meistens gemeinsam aufzu-

treten. Im Verhältnis zu Lychnose lagen aber immer nur geringe Mengen an Isolychnose vor. Ein den Anteil der Isolychnose modifizierender Einfluß der Jahreszeit, wie er von Courtois beschrieben worden war, konnte nicht festgestellt werden.

Die höheren Galactoside wurden nicht näher untersucht. In Analogie zu den Courtois'schen Ergebnissen dürfte es sich überwiegend um Galactoside der Lychnose handeln.

Stachyose trat in den vegetativen Pflanzenteilen der Caryophyllaceen nur relativ selten auf und dann auch nur neben einer etwa gleich großen oder deutlich überwiegenden Lychnosemenge. Ein gleichzeitiges Auftreten der drei Tetrasaccharide Lychnose, Isolychnose und Stachyose, wie es von Courtois (1960) für die Wurzeln von *Silene cucubalus* beschrieben worden war, konnte von uns nicht festgestellt werden. Bei gleichzeitigem Auftreten von Lychnose und Stachyose fehlte stets die Isolychnose.

Melibiose und die auch bereits von Courtois als Abbauprodukt der Lychnose beschriebene Isoplanteose traten meist nur in sehr geringen Mengen auf. Eine bei wenigen Pflanzen beobachtete größere Melibioseanhäufung erfolgte meist nach Abschluß der intensiven Oligosaccharidsynthese. Auch bei Melibiose dürfte es sich wohl um ein Abbauprodukt von Saccharosegalactosiden, isb. der Raffinose handeln.

Galactinol, das nach den Untersuchungen von Senser und Kandler (1967) bei ausgeprägten Raffinosepflanzen wie z.B. den Bignoniaceen oder Lamiaceen in etwa gleicher Menge wie die Raffinose (0,3 bis ca. 3 mg/g Fgw) vorliegt, war bei den Caryophyllaceen auf Chromatogrammen durch Sprühen mit alkalischer Silbernitratlösung nicht nachzuweisen. Dagegen trat es bei den meisten Photosyntheseversuchen mit $^{14}\text{CO}_2$ als markierte Verbindung auf. Eine quantitative Bestimmung des Galactinols nach Elution aus Chromatogrammen blieb auf Grund der zu geringen Substanzmengen ohne Erfolg.

4.2. Verbreitung der Lychnosezucker bei den Centrospermen

Innerhalb der Centrospermen und der angrenzenden Reihen der Polygonales und Cactales konnten Saccharosegalactoside vom Lychnose- bzw. Isolychnosetyp nur bei den Caryophyllaceen nachgewiesen werden, dagegen nicht bei den Molluginaceen, die als einzige Familie der Centrospermen neben den Caryophyllaceen Anthocyane enthalten. Da es sich hier meist um einjährige Kräuter aus tropischen oder subtropischen Trockengebieten handelt, mußte bei der Untersuchung leider in größerem Umfang auf Herbarmaterial zurückgegriffen werden. Aber auch das untersuchte Frischmaterial war nahezu frei von Oligosacchariden (Raffinosezucker).

4.3. Die physiologische Rolle der Raffinose und der Lychnosezucker

Die winterliche Anhäufung von löslichen Zuckern in den vegetativen Teilen ausdauernder Pflanzen der gemäßigten Zone wurde schon 1907 von Lidforss beobachtet. Sie läßt sich nach umfangreichen Untersuchungen von Jeremias (1964), Jeremias et al (1969) dahingehend erweitern, daß im Jahresverlauf bei ausdauernden Pflanzen gemäßigter und kalter Klimate zwei deutlich verschiedene Phasen der Kohlenhydratspeicherung vorliegen: Eine Sommerphase mit relativ hohem Stärkegehalt und geringen Mengen an Saccharosegalactosiden und eine Winterphase mit einem Stärkeminimum und einem ausgeprägten Galactosidmaximum. Diese erweiterte Lidforss'sche Regel läßt sich aber aus folgenden Gründen nicht ohne weiteres auf die von uns untersuchten Caryophyllaceen anwenden:

a) Saccharosegalactoside vom Lychnose- bzw. Isolychnosetyp treten auch bei einjährigen Arten wie *Sc leranthus annuus* und *Stellaria media* auf.

Bei *Stellaria media* scheint die Galactosidproduktion in erster Linie vom Alter der Pflanze abhängig zu sein. Bei einer Generationsdauer von zwei bis drei Monaten folgen mehrere Generationen im Jahr aufeinander. Die Galactosidproduktion setzt unabhängig von der Jahreszeit etwa zwei bis drei Wochen vor dem Absterben der Pflanze ein. Auch die Temperatur scheint hier keinen Einfluß auf den Beginn der

Galactosidproduktion zu haben, denn im Gewächshaus bei relativ gleichmäßiger Temperatur von ca. 20°C angezogene Pflanzen bildeten in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungszustand ebenso Lychnosezucker wie Freilandpflanzen. Auffallenderweise endete bei *Sc leranthus annuus* und *Stellaria media* aber die Reihe der Saccharosegalactoside stets beim Pentasaccharid. Höhere Oligomere konnten weder chemisch noch bei Photosyntheseversuchen in $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen werden.

b) Die Produktion der Saccharosegalactoside setzt schon im Spätsommer, in den Blättern von *Cerastium arvense* sogar schon Mitte August ein (getestet 1971 und 1972). Die intensive Galactosidproduktion begann dann 1972, wie aus der Zunahme der Galactosidpools und den Ergebnissen der Photosyntheseversuche hervorging, Anfang September zu einer Zeit, als die nächtlichen Temperaturminimas in die Nähe des Gefrierpunktes sanken. Ende Oktober bis Mitte November wurde sie aber trotz starker nächtlicher Abkühlung schon wieder weitgehend eingestellt. In den etwa ein Jahr alten Blättern von *Cerastium arvense* setzte dann schon Anfang November wieder der Abbau der Saccharosegalactoside ein, während bei den gleichalten Blättern von *Dianthus* der Pool der Galactoside bis gegen Ende Dezember in etwa konstant blieb. Eine wesentlich längere Speicherung der Galactoside war aber auch angesichts der Tatsache nicht zu erwarten, daß die Blätter beider Arten in Februar 1973 abstarben. Auch in den Sprossen von *Cerastium arvense* und *Dianthus caryophyllus* blieb das im Oktober erreichte Galactosidmaximum nicht erhalten. Da der Abbau aber relativ langsam vorsichging, blieb in den Sprossen über die ganze Ruheperiode hinweg der Pegel der Saccharosegalactoside deutlich über dem Sommerniveau. Von einer ausgesprochenen winterlichen Galactosidanreicherung kann deshalb aber nicht gesprochen werden.

c) Völlig getrennt von der spätsommerlichen bis herbstlichen Galactosidanreicherung findet Anfang Februar in den jungen, überwinterten Blättern sowie in den Sprossen eine starke Anhäufung von Saccharosegalactosiden (Raffinose und

Lychnosezucker) statt. Dieses Phänomen konnte 1972 und 1973 beobachtet werden. Der Abbau dieser Galactoside läuft dann der Wiederaufnahme des Wachstums weitgehend parallel.

d) Im Juni erfolgte schließlich bei *Cerastium* und *Dianthus* ein drittes mal im Jahresverlauf eine merkliche Galactosid-anhäufung, die allerdings wesentlich geringer war als im Frühjahr und im Herbst. Eine mehrmalige Anreicherung von Saccharosegalactosiden bei Caryophyllaceen im Jahresverlauf war bereits von Courtois et al festgestellt worden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß es sich bei der mehrmaligen Anhäufung von Raffinose und Lychnosezuckern wohl um ein anderes Phänomen handeln dürfte, als etwa bei der winterlichen Anhäufung von Raffinosezuckern in Coniferen und zahlreichen höheren Pflanzen. Letztere wird häufig in Zusammenhang mit der Frostresistenz gebracht.

Wenn nun hier die deutliche Anreicherung der Saccharosegalactoside im Herbst nach einer starken nächtlichen Abkühlung überhaupt in einen Zusammenhang mit der Erhöhung der Frostresistenz gebracht werden kann, dann wäre es nur denkbar, daß die Oligosaccharide eine frostresistenzsteigernde Funktion lediglich in der kritischen Übergangsphase beim Auftreten der ersten Nachtfröste ausüben. Da sie aber auch in Blättern angehäuft werden, die den Winter nicht überdauern, handelt es sich möglicherweise nur um schnell in Saccharose konvertierbare (und dann auch gut abzuleitende) Speichersubstanzen, die den osmotischen Wert der Zelle nicht im gleichen Maße belasten wie äquivalente Mengen an Mono- und Disacchariden.

Nach Ziegler (1971) muß die Natur der Wanderkohlenhydrate nicht mit der der dominierenden Zucker im Speicher- bzw. Empfängergewebe übereinstimmen. Dies ergab sich auch aus den Ableitungsversuchen mit *Cerastium arvense* und *Herniaria glabra*, wo trotz des Dominierens der Saccharosegalactoside in Blatt und Sproß fast ausschließlich Saccharose abgeleitet wurde. Die Caryophyllaceen verhalten sich also anders als typische

Raffinosepflanzen, die meist Stachyose und nur wenig Saccharose ableiten.

Da die in den knapp einjährigen Blättern von *Cerastium* und *Dianthus* im Herbst angehäuften Saccharosegalactoside vor dem Absterben zum größten Teil aus dem Blatt abgezogen werden, müßten sie zuvor bis zur Saccharose hydrolisiert werden.

4.4. Biosynthese von Raffinose und den Lychnosezuckern

4.4.1. Markierungskinetik der Galactoside

Bei einigen nicht näher beschriebenen Photosyntheseversuchen mit *Silene dioica* am 4.6.1971 und *Saponaria officinalis* am 15.7.1971 wurden außer Saccharose und Maltose keinerlei Oligosaccharide markiert. Saccharose dürfte hier wohl ein vorläufiges Endprodukt unter den löslichen Zuckern darstellen.

Bei den meisten Photosyntheseversuchen mit $^{14}\text{CO}_2$ traten neben Saccharose in Abhängigkeit von der Jahreszeit noch eine ganze Reihe verschiedener Oligosaccharide auf (Maltoside, Saccharosegalactoside). Von allen Oligosacchariden wurde die Saccharose grundsätzlich am stärksten markiert und erreichte ihren maximalen Markierungsanteil meist nach 30 bis 60 min. Da ihr Aktivitätsanteil bei längeren Photosynthesezeiten sowie Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ wieder absank, stellt sie hier wohl in erster Linie eine Zwischenstufe für die Bildung der Saccharosegalactoside dar.

Bei Raffinose und den Lychnosezuckern (sowie den bei *Herniaria glabra* zusätzlich auftretenden höheren Raffinosezuckern) fiel der Markierungsanteil mit steigender Zahl der Galactosen im Molekül stark ab.

Mit steigender Photosynthesezeit in $^{14}\text{CO}_2$ und auch während der Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ nahm die Markierung in den Galactosiden immer weiter zu. Lychnose, Isolychnose und die höheren Galactoside holten gegenüber der Raffinose deutlich auf und es ist deshalb anzunehmen, daß die Raffinose an der Markierung

der höheren Galactoside beteiligt ist. Die typische Markierungsfolge Raffinose $\rightarrow$ Lychnose $\rightarrow$ Isolychnose $\rightarrow$ Pentasaccharid usw. ist somit bei den Caryophyllaceen grundsätzlich anders als bei typischen Raffinosepflanzen wie etwa den Lamiaceen, wo unter den Saccharosegalactosiden in charakteristischer Weise die Stachyose schon nach kurzen Zeiten (2 bis 10 min) am stärksten markiert ist. Hier stellt allerdings die Stachyose auch ein vorläufiges Endprodukt dar, das zudem von allen Zuckern mit Abstand am besten abgeleitet wird.

Bei allen Photosyntheseversuchen mit $^{14}\text{CO}_2$, bei denen Saccharosegalactoside markiert wurden, trat auch in geringer Menge markiertes Galactinol auf. Versuche zur Poolbestimmung scheiterten an der zu geringen Substanzmenge; somit kann es kein vorübergehendes Kohlenhydratspeicherprodukt wie bei den Lamiaceen oder Bignoniaceen sein. Erstaunlicherweise zeigte es aber trotz seines geringen Pools meist keine für einen Vorläufer typische Markierungskinetik, auch wenn eine deutliche Galactosidproduktion festgestellt wurde. Häufig lag sein Aktivitätsanteil nach 30 min Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ noch unter 0,1 % des Gesamtlöslichen und zeigte dann nur einen ganz langsamen Anstieg, der sich manchmal auch noch während der Nachbelichtungsperiode fortsetzte. Auf Grund dieser Beobachtung müßte man eigentlich einen hohen Umsatz des geringen Galactinolpools ausschließen, da nach 18 Stunden Photosynthese in $^{12}\text{CO}_2$ die Aktivität wenigstens im Galactoseanteil verdrängt sein müßte.

Während bei den ausgeprägten Raffinosepflanzen die Rolle des Galactinols für die Biosynthese der Raffinosezucker (Kandler und Tanner 1966, Lehle und Tanner 1972) als gesichert gelten darf, schien es – wenigstens nach den Ergebnissen der Photosyntheseversuche – an der Biosynthese der Raffinose und der Lychnosezucker bei den Caryophyllaceen nicht beteiligt zu sein. So schien auch im Herbst einer deutlichen Nettosynthese an Saccharosegalactosiden nur ein geringer Umsatz im Galactinol gegenüberzustehen.

4.4.2. Intramolekulare ^{14}C -Verteilung in Raffinose und Lychnose

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Senser und Kandler bei typischen Raffinosepflanzen konnte bei den Photosyntheseversuchen mit Caryophyllaceen in der Raffinose niemals ein Dominieren des Galactoseanteiles (mehr als $1/3$ der Gesamtaktivität des Moleküls) festgestellt werden.

Bei Photosyntheseversuchen mit $^{14}\text{CO}_2$ außerhalb der Zeit intensiver Galactosidsynthese war in Zeiten bis zu 60 min Photosynthese keine oder nur eine geringe Aktivität in der Galactose der Raffinose festzustellen. Die Markierung der Raffinose erfolgte deshalb im wesentlichen durch den Austausch des Saccharoseteils mit dem ständig an Aktivität gewinnenden Saccharosepool. Da der Anteil der Galactose mit längeren Photosynthesezeiten und auch noch während der Nachbelichtungsperiode in $^{12}\text{CO}_2$ kontinuierlich anstieg, kann hier analog zu den eigenartigen, für Galactinol beobachteten Verhältnissen, ein hoher Umsatz der Galactose ausgeschlossen werden.

Ähnliche Markierungsverhältnisse wurden auch von Franz (1972) für Gentianose (Glucopyranosyl 1 $\rightarrow$ 6 glucopyranosyl 1 $\rightarrow$ 2 fructofuranosid) nach Photosynthese von Blättern von *Gentiana kochiana* in $^{14}\text{CO}_2$ beobachtet. Statt einer in der Markierung dominierenden äußeren Glucose fand er ein starkes Zurückbleiben ihres Anteils hinter den Monosacchariden des Saccharoseteils.

Bei Photosyntheseversuchen zur Zeit intensiver Galactosidproduktion ist die gesteigerte Synthese an der Gleichverteilung der Aktivität in der Raffinose nach 30 min Photosynthese zu erkennen. Da aber bei diesen Versuchen die Gleichverteilung über längere Photosynthesezeiten nicht erhalten bleibt, sondern der Anteil der Galactose wieder deutlich unter $1/3$ absinkt, muß postuliert werden, daß nach wie vor der Austausch des Saccharoseteils eine dominierende Rolle spielt.

Während Saccharose (6,7 mg/g Fgw) und Raffinose (7,5 mg/g Fgw) bei *Cerastium arvense* Mitte September über einen annähernd

gleich großen Pool verfügen, muß für den nach den Photosyntheseversuchen noch unbekannten Galactosiddonor ein kleiner und auch schnell durchmarkierter Pool postuliert werden. Zudem ist zu fordern, daß die Nettosynthese der Raffinose und der Austausch des Saccharoseteils nebeneinander, aber mit verschiedener Geschwindigkeit ablaufen. Wenn nun die Nettosynthese mit geringerer Geschwindigkeit als der Austausch erfolgt, dann würde bei kürzeren Photosynthesezeiten als 30 min die Nettosynthese der Raffinose durch die starke Markierung der Galactose manifestiert. Der Saccharoseaustausch mit dem noch schwach markierten Saccharosepool würde diese Aktivitätsverteilung noch kaum beeinflussen, denn es würden zunächst viel mehr unmarkierte als markierte Saccharosemoleküle über den Austausch in die Saccharose eingebaut.

Die nach 30 min Photosynthese festgestellte Uniformität in der Markierung der Raffinose würde dann dadurch zustande kommen, daß die mit fortschreitender Photosynthesezeit in $^{14}\text{CO}_2$ steigende spezifische Aktivität des Saccharosepools über den Austausch mit dem Saccharoseteil in der Raffinose das ursprüngliche Übergewicht der Galactose kompensiert. Dann müßten im Raffinosepool neben völlig unmarkierten und neben bereits uniform markierten Molekülen etwa in gleicher Anzahl nur in der Galactose markierte und nur in der Saccharose markierte Raffinosemoleküle vorliegen, wobei erstere vorwiegend aus kürzeren und letztere insbesondere aus späteren Photosynthesezeiten stammen. Bei gleichbleibend geringer Nettosynthese muß bei der ständig steigenden spezifischen Aktivität des Saccharosepools die Austauschreaktion zu einem zunehmenden Übergewicht des Saccharoseteiles und damit gleichzeitig zu dem beobachteten Absinken des prozentualen Aktivitätsanteiles der Galactose im Molekül führen.

Die Beteiligung der Isoplanteose an der Lychnosebiosynthese konnte auf Grund ihres Markierungsverhaltens ausgeschlossen werden. Es muß deshalb angenommen werden, daß Raffinose analog zur Stachyosesynthese auch bei der Lychnosebiosynthese als Acceptor der Galactose fungiert. Überraschenderweise zeigte die vermutlich zuletzt an die Fructose gebundene

Galactose aber nicht die erwartete stärkere Markierung als die die glucosylgebundene Galactose, wie es in Analogie zur Stachyosesynthese (Senser und Kandler 1967) erwartet worden wäre. Des weiteren wich die Aktivitätsverteilung im Raffinose-
teil stark von der der Raffinose ab. Dies spricht dafür, daß in der Zelle wenigstens zwei von einander unabhängige Raffinose-
pools vorliegen müssen, die verschieden groß sind und verschie-
den schnell markiert werden. Es ist anzunehmen, daß der zur
Lychnosesynthese verwendete Raffinosepool sehr klein ist, weil
er sich sonst auf Grund seiner stark abweichenden Aktivitäts-
verteilung deutlich bei der gemeinsamen Extraktion bemerkbar
machen müßte.

Die starke Markierung der Galactose im Raffinose-
teil der Lychnose läßt vermuten, daß die am Synthesort der Lychnose
neu entstehende Raffinose einen starken Umsatz aufweist.
Dabei würde

- a) die neugebildete Raffinose bei der Lychnosenettosynthese
verbraucht
 - b) die Raffinose mit dem Raffinose-
teil der Lychnose austauschen.
- Durch diese Austauschreaktion würden dauernd markierte Raffi-
nosemoleküle auch in die schon vor Beginn der Photosynthese
in $^{14}\text{CO}_2$ gebildeten Lychnosemoleküle eingebaut, wobei die an
die Fructose gebundene Galactose im Gegensatz zu der an die
Glucose gebundenen Galactose unmarkiert bliebe. Wenn die Aus-
tauschreaktion und die Nettosynthese parallel ablaufen, hängt
die Verteilung der Markierung in der Lychnose vom Verhältnis
der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten ab. Überwiegt die Aus-
tauschreaktion, so wird der Anteil der an Fructose gebundenen
Galactose niedriger sein als der Anteil der an die Glucose
gebundenen Galactose.

4.4.3. Fütterungsversuche mit ^{14}C -markierten Zuckern

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche bestätigen im wesent-
lichen die schon aus den Photosyntheseversuchen erhaltenen
Befunde. So wurden bei den Fütterungsversuchen außerhalb der
Periode intensiver Galactosidsynthese alle verfütterten
Zucker primär zum Aufbau von Saccharose verwendet; die Markie-

rung der Galactoside erfolgte erst durch Austauschreaktionen (Saccharoseaustausch bei Raffinosemarkierung, Raffinoseaustausch bei Lychnosemarkierung).

Wenn dagegen im Herbst die Synthese von Galactosiden über die der Saccharose dominiert, so wird dies augenfällig durch die Markierung der Galactose(n) demonstriert, die bei Fütterung von freien, markierten Monosacchariden stets deutlich über der von Glucose und Fructose liegt. Auf Grund der leichten Konvertierbarkeit der Monosaccharide, die vor allem auf der Stufe der Phosphatester und Nucleotide erfolgt (Hassid et al 1959), werden Glucose und Fructose etwa gleich gut wie Galactose in den Galactoseteil der Saccharosegalactoside eingebaut.

4.4.4. Enzymversuche zur Biosynthese der Raffinose und der Lychnose

In den zur Zeit der herbstlichen Galactosidproduktion vorgenommenen Enzymversuchen konnte die auf Grund der intramolekularen Aktivitätsverteilung in der Raffinose nach Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ postulierte Austauschreaktion zwischen Raffinose und Saccharose nachgewiesen werden. Diese Reaktion war schon von Moreno und Cardini (1966) in Weizenkeimlingen und von Lehle (1972) in Samen von *Vicia faba* festgestellt worden. Die Erklärung der ungewöhnlichen ^{14}C -Verteilung in der Raffinose nach Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ mit der Tätigkeit einer Raffinose-Saccharose-Transgalactosidase darf damit als gesichert angesehen werden. Die Bedeutung des Galactinols für die Biosynthese der Raffinose bei *Cerastium arvense* war nach seinem Verhalten in der Markierungskinetik nicht eindeutig zu erkennen. Die Versuche haben aber gezeigt, daß Galactinol tatsächlich der Galactosyldonor der Raffinosesynthese bei *Cerastium arvense* ist.

Obwohl die Pflanzen, aus denen die Enzympräparationen gewonnen wurden (mit denen auch eine Raffinosebiosynthese mit Galactinol als Galactosyldonor erhalten wurde), Lychnose anhäuften, konnte bei den Enzymversuchen weder der Nachweis der postulierten Austauschreaktion zwischen Lychnose und Raffinose noch der einer Lychnosesynthese mit Raffinose als Galactosylacceptor

erbracht werden. Die Ursache könnte der Einsatz falscher Galactosyldonatoren sein. Es wäre aber auch denkbar, daß das Enzym auf Grund besonderer Stabilitätseigenschaften unter den gewählten Präparationsbedingungen nicht mehr aktiv ist.

Anhang Tab. 2: Prozentualer Anteil verschiedener Oligosaccharide und Galactinol am ^{14}C -gehalt der löslichen Fraktion und intramolekulare ^{14}C -Verteilung in Raffinose und Lychnose in %.

Objekt	Datum	PS - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Lösli.-Fraktion) cpm $\cdot 10^3 / \text{mg Frw}$	Saccha- rose %-Anteil	Raffinose %-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal	Glu	Fru	Gal	Lychnose %-Anteil	Iso- Lychnose %-Anteil	Galac- tinol %-Anteil
Silene dioica	20.10.71	60'	68			6,9	43,6	49,5										
		3 ^h	162			6,9	47,9	45,2										
		6 ^h	122			19,4	41,1	39,5										
		6 ^h +	100			28,0	36,0	36,0										
		18 ^h																
Viscaria vulg.	18.10.71	60'	315	71,2	1,2											0,4	0,1	0,57
		3 ^h	625	56,4	3,0	15,8	42,0	42,2								0,2	0,2	0,37
		6 ^h	695	54,4	2,9	14,3	42,6	43,1								0,3	0,2	0,37
		6 ^h +	593	31,7	1,9	15,9	42,9	41,2								0,44	0,41	0,15
		18 ^h																

5. Zusammenfassung

I.1. Aus Sprossen und Blättern von *Dianthus caryophyllus* und anderen stark lychnosehaltigen Caryophyllaceen wurden durch Chromatographie an einer Ionenaustauschersäule Dowex 50 WX 2 200 - 400 mesh 0,9 g Lychnose als weißes, amorphes Pulver erhalten. Versuche zur Kristallisation blieben ohne Erfolg.

2. Lychnose und Isolychnose konnten in der Reihe der Centrospermen nur bei den Caryophyllaceen nachgewiesen werden. Sie kommen hier bei einjährigen wie bei ausdauernden Arten in allen vegetativen Pflanzenteilen vor. Stachyose und die höheren Glieder der Raffinosefamilie treten neben den Lychnosezuckern nur relativ selten auf. Bei Vorliegen von Stachyose fehlt stets Isolychnose.

Alle untersuchten Samen waren frei von Lychnosezuckern. Das höchste hier aufgefundene Saccharosegalactosid war das Tetrasaccharid Stachyose. Bei den Caryophyllaceen erlaubt also das Zuckerspektrum der Samen keinerlei Rückschlüsse auf das der vegetativen Pflanzenteile.

3. Bei den Caryophyllaceen ist Raffinose das bei weitem dominierende Saccharosegalactosid. Ihr gegenüber fällt die Menge der Lychnose stark ab. Isolychnose wiederum kommt unabhängig von der Jahreszeit stets nur in Bruchteilen der Lychnosemenge vor.

Galactinol konnte auf Papierchromatogrammen chemisch nicht nachgewiesen werden, wurde aber bei Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ markiert.

Raffinose, Lychnose und die höheren Galactoside zeigen charakteristische Konzentrationveränderungen im Jahresverlauf: Starke Galactosidanhäufung erfolgt von Oktober bis November, Anfang Februar bis zur Wiederaufnahme des Wachstums und im Juni. Der erreichte maximale Pegel an Galactosiden bleibt in keinem Fall über längere Zeit erhalten.

Eine nennenswerte Ableitung von Raffinose und Lychnose konnte nicht festgestellt werden; es wird fast ausschließlich Saccharose abgeleitet.

II.1. Bei Photosyntheseversuchen mit Blättern verschiedener Caryophyllaceen in $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Oligosaccharide in der Reihenfolge Saccharose $\rightarrow$ Raffinose $\rightarrow$ Lychnose $\rightarrow$ Isolychnose $\rightarrow$ höhere Galactoside $\rightarrow$ Melibiose markiert. Während der Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$ nimmt die Aktivität in den Galactosiden der Saccharose und häufig auch im Galactinol weiter zu.

Isoplantose scheidet auf Grund ihrer Markierungskinetik als Galactoseacceptor bei der Lychnosebiosynthese aus. Sie dürfte wie die Melibiose ein Abbauprodukt sein.

2. Die Analyse der intramolekularen ^{14}C -Verteilung in Raffinose und Lychnose ergab in Abhängigkeit von der Jahreszeit zwei grundsätzlich verschiedene Markierungsmuster:

a) Raffinose: Außerhalb der Perioden intensiver Galactosidproduktion ist die Galactose bis zu Photosynthesezeiten von 60 min nicht oder nur schwach markiert. Ihr Anteil steigt mit längerer Photosynthesezeit in $^{14}\text{CO}_2$ und auch noch während der Nachbelichtung in $^{12}\text{CO}_2$, erreicht aber auch nach 6 Stunden Photosynthese nicht das Niveau von Glucose oder Fructose. Während der Zeit intensiver Galactosidsynthese liegt schon nach 30 min Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ im Molekül Gleichverteilung der Aktivität vor.

b) Lychnose: In der Lychnose ist der Anteil der fructosylgebundenen Galactose geringer als der der glucosylgebundenen Galactose. Mit fortschreitender Photosynthesezeit steigt er zwar an, ohne aber den Wert der an die Glucose gebundenen Galactose zu erreichen.

Außerhalb der Galactosidsynthesezeit ist die glucosylgebundene Galactose schwächer markiert als Glucose oder Fructose.

Während der Galactosidsynthese liegt dagegen ihr Aktivitätsanteil nach 60 min Photosynthese sogar über 50 %.

Auf Grund des Markierungsverhaltens der Galactose(n) in Raffinose und Lychnose muß angenommen werden, daß bei der Markierung der beiden Oligosaccharide stets zwei Vorgänge parallel ablaufen:

a) der Austausch des Saccharoseteiles in der Raffinose und des Raffinoseteils in der Lychnose.

b) die Nettosynthese von Raffinose und Lychnose mit Saccharose und Raffinose als Galactoseacceptoren.

III. Die Fütterung U-¹⁴C-markierter Zucker bestätigte die aus den Photosyntheseversuchen erhaltenen Ergebnisse. Ein Rückschluß auf den Galactosedonor für die Biosynthese von Raffinose und Lychnose konnte nicht gezogen werden.

IV. Die Rolle des Galactinols als Galactosyldonor bei der Biosynthese der Raffinose sowie die Austauschreaktion des Galactosylrestes zwischen Raffinose und Saccharose konnten in zellfreien Extrakten nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Bourne, E.J., Walter M.W. and Pridham J.B.: The biosynthesis of Raffinose.

Biochem.J. 97, 802 - 806, 1965

Cleland, W.W.: Dithiothreitol, a new protein reagent for SH-groups

Biochemistry 3, 482 - 488, 1964

Courtois, J.E.: Les galactosides du saccharose

Bull.soc.chim.biol. 42, 1451 - 1466, 1960

Courtois, J.E., Le Dizet P. et Petek F.: Recherches sur les galactosides du *Lychnis dioica*. Isolement et structure d'un nouveau monogalactoside du saccharose.

Bull.soc.chim.biol. 41, 1261 - 1270, 1959

Courtois, J.E., Ariyoshi U.: Les galactosides du saccharose des racines de *Cucubalus baccifer*. Etude de leur structure.

Bull.soc.chim.biol. 42, 737 - 751, 1960

Courtois, J.E., Ariyoshi U.: Les galactosides du saccharose de quelques graines de Caryophyllacées.

Bull.soc.chim.biol. 44, Nr. 1, 31 - 36, 1962

Courtois, J.E., Ariyoshi U.: Les galactosides du saccharose des racines d'oeillet.

Bull.soc.chim.biol. 44, 25-29, 1962

Courtois, J.E., Ariyoshi U.: Les galactosides du saccharose des racines d'oeillet.

Bull.soc.chim.biol. 44, 23 - 29, 1962

Cumming, C.F.: Nucleotides in developing larch tissue.

Biochem.J. 116, 196 - 198, 1970

Dey, P.M. and Pridham J.B.: Biochemistry of - Galactosidases. Advances in enzymology and related areas of molecular biology Vol 36, 91 - 130, 1972

Franz G. und Meier H.: Untersuchungen über Vorkommen und Physiologie des Trisaccharids Gentianose.

Z.Pflanzenphysiol. Bd. 66, 433 - 439, 1972

Hassid W.Z., Neufeld E.F. and Feingold D.S.: Sugar nucleotides in the interconversion of carbohydrates in higher plants. in: Proc.N.A.S. Vol 45, Nr.7, 905 - 915, 1959

Hofmann F., Kull U. und Jeremias K.: Markierung von Kohlenhydraten in Blättern nach Fütterung von ^{14}C -Galactose.

Z.Pflanzenphysiol. Bd.64, 223 - 231, 1971

Jeremias K.: Über die jahresperiodisch bedingten Veränderungen der Ablagerungsform der Kohlenhydrate in den vegetativen Pflanzenteilen unter besonderer Berücksichtigung der Zucker der Raffinosegruppe.

Bot. Studien 15, Jena.

Jeremias K.: Zur winterlichen Zuckeranhäufung in vegetativen Pflanzenteilen.

Ber. Dtsch.Bot.Ges. Bd. 82, H.1/2, 87 - 97, 1969

Kandler O.: Möglichkeiten zur Verwendung von ^{14}C für chemotaxonomische Untersuchungen.

Ber.Dtsch.Bot.Ges. LXXVII, 62 - 73, 1964

Lehle L.: Dissertation Universität München 1972

Loomis W.D. and Bataille J.: Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.

Phytochemistry Vol. 5, 423 - 438, 1966

Moreno A. and Cardini C.E.: A raffinose-sucrose transgalactosidase from wheat germ.

Plant Physiol. 41, 909 - 910, 1966

Nikaido H. and Hassid W.Z.: Synthesis of oligosaccharides. in: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Vol. 26 352 - 439, 1971

Ortmann R., Sandermann H. and Grisebach H.: Transfer of apiose from UDP-apiose to 7-O-(β -D-glucosyl)-apigenin and 7-O-(β -D-glucosyl)-chrysoeriol with an enzyme preparation from parsley Febs letters, Vol. 7 Nr. 2, 164 - 166, 1970

Parker J.: Variations in sugars and starch in longleaf pine trees of different seed producing capacity.

Off. Rep. Mimeog, East Gulfcast Branch, So. For. Exp. Sta., Mariama, Fla.

Pridham J.B. and Hassid W.Z.: Biosynthesis of Raffinose.

Plant Physiol. 40, 984 - 986, 1965

Putman E.W. and Hassid W.Z.: Sugar transformation in leaves of *Canna indica*.

J. Biol. Chem. 207, 885 - 902, 1954

Senser M. und Kandler O.: Galactinol, ein Galactosyldonor für die Biosynthese der Raffinosefamilie in Blättern.

Zeitschr. Pflanzenphysiol. Bd. 57, H. 4, 376 - 388, 1967

Senser M., Dittrich P., Kandler O., Thanbichler A. und Kuhn B.: Isotopenstudien über den Einfluß der Jahreszeit auf den

Oligosaccharidumsatz bei Coniferen.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 84, H. 7/8, 445 - 455, 1971

Tanner W. und Kandler O.: Biosynthesis of stachyose in
Phaseolus vulgaris.

Plant Physiol. 41, 1540 - 1542, 1966

Ziegler H.: Wasserumsatz und Stoffbewegungen. in:

Fortschritte der Botanik Bd. 33, 63 - 84, 1971

Verwendete Übersichtsliteratur

Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.

Verlag Chemie Weinheim / Bergstraße 1970

Ruhland, W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. VI

Springer Heidelberg 1955

Stanek J., Cerný M., Pacák J.: The Oligosaccharides

Academic Press New York and London 1965

Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L.: Methods in Carbohydrate
Chemistry.

Academic Press New York and London

Methods in Enzymology. Vol. VIII (1964) und Vol. XXVIII (1972)

Academic Press New York

Anhang Tab. 1: Prozentualer Anteil verschiedener Oligosaccharide und Galactinol am ^{14}C -Gehalt der löslichen Fraktion und intramolekulare ^{14}C -Verteilung in Raffinose und Lychnose in %.

Objekt	Datum	Ps - Zeit	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung (Lösli.-Fraktion)	cpm $\cdot 10^3 / \text{mg N}_{\text{GW}}$	Saccharose			Raffinose			Lychnose			Iso-Lychnose		Galac-
					%-Anteil	Gal	Glu	Fru	%-Anteil	Gal	Glu	Fru	Gal	%-Anteil	Lychnose	tinol
<i>Plantanus caryophyllus</i>		30'	525	75,9	0,6	0	52,8	47,2	0	0	0,10	0	0,10	0	0,14	0,14
		60'	568	73,8	1,0	1,9	49,7	48,4	0	0	0,10	0	0,10	0	0,16	0,16
		3 ^h	6144	76,8	0,9	7,0	46,2	46,8	0	0	0,16	0	0,16	0	0,14	0,14
		6 ^h	4630	50,7	0,9	15,4	41,0	43,6	0	0	0,14	0	0,14	0	0,14	0,14
		6 ^h +	5594	29,9	2,3	18,9	44,3	36,8	0,1	0,1	0,14	0	0,14	0	0,14	0,14
		^{18}N														
<i>Plantanus caryophyllus</i>		5'	30	60,9	0,6	0	55,1	44,9	0	0	0,24	0	0,24	0	0,17	0,17
		30'	83	75,7	1,9	0	47,2	52,8	0	0	0,17	0	0,17	0	0,16	0,16
		60'	236	70,0	4,3	3,6	46,2	50,2	0	0	0,16	0	0,16	0	0,17	0,17
		3 ^h	306	60,7	7,7	8,5	44,9	46,6	0,10	0,10	0,17	0	0,17	0	0,15	0,15
		6 ^h	173	48,9	4,3	12,8	42,2	45,0	0,14	0,14	0,12	0	0,12	0	0,5	0,5
		6 ^h +	571	26,9	10,0	14,4	39,5	46,1	1,6	1,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,10	0,10
		^{18}N														

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. O. Kandler am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Professor Kandler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der erforderlichen Mittel und für die finanzielle Unterstützung, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Ganz besonders danke ich für die wertvollen Anregungen und Ratschläge im Verlauf der Arbeit und bei ihrem Abschluß.

Für wertvolle Hinweise danke ich Herrn Dr. H. Hopf, nicht zuletzt auch Frau P. Eichel, die durch ihre gewissenhafte technische Assistenz bei einem Teil der Versuche den Fortgang der Arbeit gefördert hat.

Lebenslauf

Am 4.12.1942 wurde ich als zweites Kind des Dr.Ing. Waldemar Schwarzmaier und seiner Ehefrau Karola, geb. Raab in Ulm geboren.

Nach dem Umzug meiner Eltern nach Taufkirchen besuchte ich in Taufkirchen die Volksschule und trat 1952 in das Wilhelms-gymnasium in München über, wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend trat ich dann in den Bundesgrenzschutz als Offizieranwärter ein, aus dem ich nach Ableistung der Wehrpflicht nach 18 Monaten als Fahnenjunker freiwillig ausschied.

Von 1965 bis 1970 studierte ich an der Universität München Biologie und Chemie und legte im Frühjahr 1970 das Staatsexamen ab. Ab Oktober 1970 arbeitete ich am Botanischen Institut der Universität München an der vorliegenden Dissertation.

Seit 17.9.1973 bin ich Studienreferendar am Maria-Theresia-Gymnasium München.

1970 heiratete ich Fräulein Masako Yokoyama. Wir haben inzwischen zwei Kinder im Alter von $2\frac{3}{4}$ und 1 Jahr.

